Aus dem Hygiene-Institut der Universität Marburg
Direktor: Professor Dr. med. R. Siegert

Untersuchungen zur Eignung von Pyrimidinnucleosiden als Nucleinsäurevorläufer von Candida albicans

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde

dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Karl-Ulrich Sander
aus Kassel

Marburg/Lahn 1972

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg (Lahn)

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Marburg
Direktor: Professor Dr. med. R. Siegert

Untersuchungen zur Eignung von Pyrimidinnucleosiden als Nucleinsäurevorläufer von Candida albicans

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde

dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Karl-Ulrich Sander

aus Kassel

Marburg/Lahn 1972

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg (Lahn)

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg am: 14. November 1972

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches

Dekan: Prof.Dr.H.Oepen

Referent: Doz.Dr.D.Müller

Correferent: Prof.Dr.Dr.H.Heuser

INHALTSVERZEICHNIS

A. Einleitung 1

B. Allgemeine Methodik 3

I. Zellzüchtung 3

1. Zellstamm 3
2. Nährboden 3
3. Temperatur 3
4. Zellzählungen 3

II. Durchführung der radioaktiven Versuche 3

III. Herstellung und Auswertung der Autoradiogramme 4

1. Herstellung der Autoradiogramme 4
2. Auswertung der Autoradiogramme 4

IV. Extraktion und enzymatischer Abbau der Nucleinsäuren 5

1. Nucleinsäureextraktion 5
2. Enzymatischer Abbau der Nucleinsäuren 5

V. Hochspannungselektrophoretische und papierchromatographische Auftrennung der Pyrimidinnucleotide 6

1. Hochspannungselektrophorese 6
2. Papierchromatographie 7

VI. ^{3}H-Aktivitätsmessungen 8

C. Versuchsdurchführung und Ergebnisse 10

I. Die Bestimmung der Verdoppelungszeit von C. albicans 10

1. Zellvermehrung von C. albicans auf festem Nährboden (SABOURAUD) 10
2. Zur Vermehrung von C. albicans in flüssigem Nährmedium 10
3. Die Berechnung der Verdoppelungszeit (T) 10

II. Die Bestimmung des Trockengewichtes von C. albicans 13

III. Die Bestimmung des DNS-Gehaltes von Candida albicans 13

IV. Verwertung von Pyrimidin-Nucleosiden und -desoxynucleosiden für die Nucleinsäuren von Candida albicans 14

1. Die Verwertung von ^{3}H-CdR-(5-T) 15
2. Die Verwertung von ^{3}H-CdR-(G) 15
3. Die Verwertung von ^{3}H-Cytidin-(G) 16
4. Die Verwertung von ^{3}H-UdR-(G) 17
5. Die Verwertung von ^{3}H-Uridin-(G) 18

V. Untersuchungen zur Verwertung von ^{3}H-Thymidin für die Nucleinsäure-Synthese von Candida albicans 19

1. Biochemische Untersuchungen 19
2. Autoradiographische Untersuchungen 21

D. Diskussion 28

I. Zur Verdoppelungszeit von Candida albicans 28

II. Zum DNS-Gehalt von Candida albicans 29

III. Ueber die Verwertung verschiedener Pyrimidin-nucleoside und -desoxynucleoside für die Nucleinsäuresynthese von Candida albicans 33

IV. Ueber die Verwertung des ^{3}H-Thymidin für die DNS-Synthese von C. albicans 36

E. Zusammenfassung 41

F. Literaturverzeichnis 43

A. EINLEITUNG

Zur Aufklärung des Nucleinsäurestoffwechsels finden in zunehmendem Masse radioaktiv-markierte Vorläufer wie Purin- und Pyrimidinbasen sowie die entsprechenden Nucleoside und Nucleotide Verwendung. Der Einbau dieser "fertigen Bausteine" in die DNS und RNS kann durch die Anwendung biochemischer Methoden oder auch der autoradiographischen Technik verfolgt werden.

Bisher wurden Untersuchungen mit radioaktiv-markierten Vorläufern vorwiegend an Säugetierzellen durchgeführt. Erste Fütterungsversuche mit ^{15}N-markiertem Uracil, Thymin und Cytosin bei Säugetieren führten zu dem Ergebnis, dass diese Basen nicht in die Nucleinsäuren eingebaut werden (PLENTL und SCHOENHEIMER, 1944; BENDICH et al., 1949). Die Verwendung ^{14}C-markierten Uracils und Thymins zeigte später jedoch einen allerdings geringfügigen Einbau in die Nucleinsäuren (CANELLAKIS, 1955).

Einen stärkeren Einbau als den der Basen lassen die Nucleoside erkennen. Die Verabreichung von Cytidin, Uridin und Desoxycytidin an Ratten ergab, dass diese Nucleoside für die Nucleinsäuresynthese verwertet werden (HAMMARSTEN et al., 1949, 1950; REICHARD und ESTBORN, 1951).

Eine besondere Stellung unter den Nucleosiden nimmt das Thymidin (TdR) als Nucleinsäurevorläufer ein, das von nahezu allen biologischen Objekten für die DNS-Synthese ausgenutzt werden kann (RACHMELER, 1961) und das radioaktiv-markiert als Indikator für den DNS-Stoffwechsel verwendet wird. In Verbindung mit der autoradiographischen Technik konnten AMANO, MESSIER und LEBLOND (1959) nachweisen, dass es ausschliesslich in die DNS eingebaut wird, also als spezifischer Vorläufer der DNS gelten kann. Nach ^{3}H-TdR-Verabreichung ist die ^{3}H-Aktivität aus Gewebsschnitten von Mäusen durch eine DNase-Behandlung vollständig zu beseitigen (AMANO et al., 1959). Bei HeLa-Zellen konnten nach ^{3}H-TdR-Inkubation 98 % der autoradiographisch nachweisbaren ^{3}H-Aktivität durch die gleiche Behandlung beseitigt werden (MÜLLER, 1966).

Verabreichtes ^{3}H-TdR ist jeweils nur zu einem gewissen Teil an der Neubildung von DNS-TdR beteiligt, wobei die Grösse dieses Anteils von der Konzentration des Vorläufers abhängt (STEWART et al., 1965; LANG, PILGRIM und MAURER, 1966; LANG, MÜLLER und MAURER, 1968). Nicht für die DNS-Synthese verwendetes TdR wird rasch abgebaut (MARSH und PERRY, 1964; COOPER und MILTON, 1964; JAQUEZ, 1962; ZAJICEK, BERNSTEIN und ROSIN, 1963; LANG, MÜLLER und MAURER, 1966).

Die bisher erwähnten Untersuchungen wurden vorwiegend an Säugetierzellen durchgeführt; vergleichbare Untersuchungen an Sprosspilzen liegen dagegen bisher nur in geringem Umfange vor. So verfolgten SARKAR und PODDAR (1965) den Einbau von ^{3}H-TdR bei Saccharomyces cerevisiae durch die Anwendung der autoradiographischen Technik. Sie konnten eine Markierung der DNS durch das verabreichte ^{3}H-TdR nachweisen. Im Widerspruch hierzu stehen die Ergebnisse von LOCHMANN (1965), der bei der Verwendung der gleichen Zellart selbst nach Angebot grosser Mengen des markierten Vorläufers im Kulturmedium nur eine sehr geringe Inkorporation feststellen konnte. Der Sprosspilz Candida albicans wurde zu derartigen Untersuchungen bisher jedoch noch nicht herangezogen.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Utilisation verschiedener Pyrimidinnucleoside für die Nucleinsäuresynthese zu prüfen und dabei festzustellen, in welchem Ausmass diese für die RNS und DNS verwendet werden. Besonderes Augenmerk gilt dabei dem Thymidin, und es soll untersucht werden, ob durch dessen Verwendung in Verbindung mit der autoradiographischen Technik Aufschluss über den Generationszyklus gewonnen werden kann. Als Untersuchungsobjekt wird der Sprosspilz Candida albicans verwendet.

B. ALLGEMEINE METHODIK

I. Zellzüchtung

1. Zellstamm: Für alle Versuche fand der Stamm C. albicans (256 Robin Berkhout) Verwendung, der vom Zentralbureau voor Schimmelkultures, Delft, Niederlande, bezogen worden war. Die Pilzkulturen wurden wöchentlich überimpft.

2. Nährboden: a) Fester Nährboden: SABOURAUD-Maltose-Agar (DIFCO, Detroit, Michigan, U.S.A.).

b) Flüssiger Nährboden: Dextrose 2,0 g, Pepton 2,0 g, aqua dest. ad 100,0 g.

3. Temperatur: Die Züchtung der Zellen erfolgte bei 30° C, entweder im Brutschrank oder im thermostatisch regulierten Wasserbad. Bei Verwendung von flüssigem Medium wurden die Zellen mittels Magnetrührer in Suspension gehalten.

4. Zellzählungen: Es wurden Verdünnungen der Suspensionen mit physiologischer NaCl-Lösung sowie nachfolgend mit Lactophenol-Wasserblau in einem Verhältnis von 1 : 1 hergestellt, wobei eine Zellzahl von 50 - 100 Zellen pro Eckquadrat in einer NEUBAUER-Zählkammer erreicht wurde. Es wurden bei 80-facher Vergrösserung jeweils mindestens 6 Kammerfüllungen ausgezählt. In besonderen Fällen erfolgte die Zählung von 10 000 Zellen in entsprechend ca. 150 Eckquadraten.

II. Durchführung der radioaktiven Versuche

Die Inkubation radioaktiv-markierter Vorläufer geschah stets in flüssigem Medium.

Es wurden ^{3}H-markierte Vorläufer verwendet, bei denen Tritium entweder in nur einer Position vorlag oder aber solche, bei denen Tritium in verschiedenen Positionen innerhalb des Moleküls angeordnet war. Die letztgenannten Vorläufer werden mit "G" (generally labeled) bezeichnet. Die radioaktiv-markierten Substanzen wurden von "RADIO-

CHEMICAL CENTER", Amersham, England, und von "NEW ENGLAND NUCLEAR CORPORATION", Boston, Mass., U.S.A., bezogen.

Zu den verschiedenen Zeiten nach Inkubationsbeginn wurden aliquote Teile der Suspension entnommen und zur Herstellung von Autoradiogrammen oder zur Extraktion der Nucleinsäure verwandt. Zur Anfertigung von Autoradiogrammen wurden die Suspensionen bei hinreichender Zelldichte sofort oder aber nach Konzentration der Zellen (Zentrifugation und Resuspendierung in geringerem Volumen) auf Objektträger aufgetropft. Nach Lufttrocknung erfolgte für ca. 10 min. eine Fixierung in CARNOYscher Flüssigkeit. Zur anderweitigen Verarbeitung des Zellmaterials wurden nach der Inkubation aliquote Teile der Suspension rasch auf 0°C abgekühlt, das Sediment zweimal gewaschen und bei -30°C aufbewahrt.

III. Herstellung und Auswertung der Autoradiogramme

1. Herstellung der Autoradiogramme: Zur Entfernung der säurelöslichen, nicht in die DNS eingebauten Derivate des ^{3}H-TdR wurden die Präparate wie folgt gewaschen: 1 h 5%-ige Trichloressigsäure (TCE), 1/2 h fliessendes Wasser, 3 h 0,05%-ige Lösung von nicht-radioaktiv-markiertem TdR, 1 h fliessendes Wasser. Die Autoradiogramme wurden mit "unsupported stripping-film", V 1062, KODAK, London, hergestellt, nachdem am Vortag die Objektträger in Chromalaungelatine getaucht worden waren. Die Expositionszeit betrug 5 Tage. Die Entwicklung erfolgte bei 20°C (±0,2) und dauerte 4,0 min. Es wurde bei 20°C etwa 15 min. fixiert. Die trockenen Präparate wurden mit Toluidinblau durch den Film hindurch gefärbt und mit Glyceringelatine eingedeckt.

2. Auswertung der Autoradiogramme: Für jeden Messpunkt erfolgte die Auswertung von 6 Präparaten. Der Prozentsatz der markierten Zellen wurde durch Auszählung von jeweils 1 000 Zellen pro Präparat ermittelt. Die Bestimmung der mittleren Silberkornzahl über den markierten Zellen (SkZ/mZ) geschah durch Auszählung von jeweils mindestens 1 000 Silberkörnern pro Präparat. Für diese Auswertung wurde ein in 20 x 20 Felder eingeteiltes Planquadrat benutzt, das bei der verwendeten Optik (Oelimmersion 100 x) eine Gesamtfläche von 80 x 80 μ begrenzt.

Der Nulleffekt wurde berücksichtigt, indem über zellfreien Flächen die Silberkornzahl ermittelt und auf die durchschnittliche Zellfläche umgerechnet wurde. Die Bestimmung der mittleren Zellfläche erfolgte in Anlehnung an die Methode von HAUG (1955). Sie betrug im Mittel 6,58 μ^2. Der Nulleffekt lag im allgemeinen unter 0,03 Silberkörner pro Zellfläche. Die mittlere Silberkornzahl pro markierte Zelle betrug etwa 4. Die SkZ/mZ wurde auf eine Expositionszeit von 1 Tag umgerechnet.

IV. Extraktion und enzymatischer Abbau der Nucleinsäuren

1. Nucleinsäureextraktion: Die Extraktion erfolgte in Anlehnung an die Methode von SCHNEIDER (1945). Die Homogenisierung des in Wasser aufgenommenen Sediments (1 Teil Sediment, ca. 5 Teile Wasser) geschah mittels Ultraschall ("ULTRASONIC", MULLARD EQUIPMENT, Ltd., England). Das Homogenisat wurde mit einer 10 %-igen Lösung von Trichloressigsäure (TCE) aufgenommen (1 Teil Homogenisat und 2 Teile TCE). Nach der Zentrifugation wurde das Sediment wiederholt in eisgekühlter, jedoch jetzt 5 %-iger TCE aufgenommen. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Daraufhin erfolgte die Hydrolyse des trokkenen Sedimentes in wenigen ml 5 %-iger TCE-Lösung bei 90°C, 15 min. Nach der Zentrifugation wurden die Ueberstände zweimal abpipettiert und das Sediment erneut in 5 %-iger TCE (90°C) aufgenommen. Die gesammelten Ueberstände, welche die DNS und die RNS enthielten, wurden vereinigt. Die Ueberstände waren klar; die Biuret-Probe (MARKHAM et al., 1950) war negativ. Die Diphenylreaktion nach DISCHE (1930) zum DNS-Nachweis war positiv, ebenso wie die Orceinreaktion nach MEJBAUM (1939) zum Nachweis von RNS. Der DNS-Gehalt wurde photometrisch bei 595 nm nach Durchführung der Diphenyl-Reaktion bestimmt.

2. Enzymatischer Abbau der Nucleinsäuren: Dieser erfolgte in zwei Schritten (siehe DOMAGK, 1964) zunächst durch Anwendung von Desoxyribonuclease (DNase) (DNase I, krist., reinst, 90 000 dornase-E/mg, SERVA-Entwicklungslabor, Heidelberg) bei Anwendung von Mg^{++}, bei pH 7,0 und bei 37°C während ca. 2 h; durch nachfolgende Behandlung mit Phosphodiesterase wurden die entstandenen Oligonucleotide der DNS sowie der RNS zu Mononucleotiden weiter abgebaut.

Die Phosphodiesterase wurde aus Schlangengift von "Crotalus atrox" (SERVA-Entwicklungslabor, Heidelberg) mittels Säulenchromatographie mit Cellulosepulver (MN 2100, MACHERY und NAGEL, Düren, Rhld.) gewonnen und gefriergetrocknet.

Die Phosphodiesterase-Behandlung erfolgte während ca. 2 h bei 37°C, wobei der pH 8,4 durch einen Autotitrator (Typ III/C, RADIOMETER, Copenhagen, Dänemark), konstant gehalten wurde. Die Volumina betrugen bei Beginn der Phosphodiesterase-Einwirkung ca. 10 ml, am Ende ca. 15 ml. Bei Beginn der Enzymeinwirkung lag die Konzentration der DNS zwischen 0,0012 und 0,0018 %, diejenige der DNase zwischen 0,04 und 0,08 %, die der Phosphodiesterase zwischen 0,075 und 0,22 %. Die Molarität des Mg^{++} betrug 0,035.

V. Hochspannungselektrophoretische und papierchromatographische Auftrennung der Pyrimidinnucleotide

Nach der enzymatischen Auftrennung der Nucleinsäuren wurden die Nucleotide im Rotationsverdampfer bei 50°C bis zur Trockene eingedampft und der Rückstand in 0,5 ml Wasser und 0,5 ml einer Lösung von nicht radioaktiv-markierten entsprechenden Nucleotiden aufgelöst. Die nicht markierten Monophosphate lagen dabei jeweils in einer 0,001 %-igen Lösung vor.

1. Hochspannungselektrophorese: Die Blattgrösse des Papiers ("2214 MN ff), (MACHERY und NAGEL, Düren, Rhld.) betrug 345 x 570 mm. Puffer: Essigsäure-Natriumacetat-Puffer nach WALPOLE, 0,6 m, pH 3,6. Das Papier wurde zunächst für 10 min. mit Pufferlösung getränkt. Die Auftragsstelle lag 8 cm von linken Blattrand (Kathode) und 8 cm vom unteren Blattrand entfernt (siehe Abb. 1a). Hier wurden 20 µl der die aufzutrennenden Substanzen enthaltenden Lösung aufgetragen. Temperatur bei der Auftrennung: 0 - 2°C, Spannung: 2,4 kV, Laufzeit: 5 h.

Nach Trocknung des Pherogramms bei ca. 100°C erfolgte die Identifizierung der Flecken mittels UV-Licht (254 nm). Dabei zeigte sich, dass die Monophosphate in zwei Gruppen in Richtung auf die Anode gewandert waren (siehe Abb. 1a). CMP und dCMP wiesen eine geringere

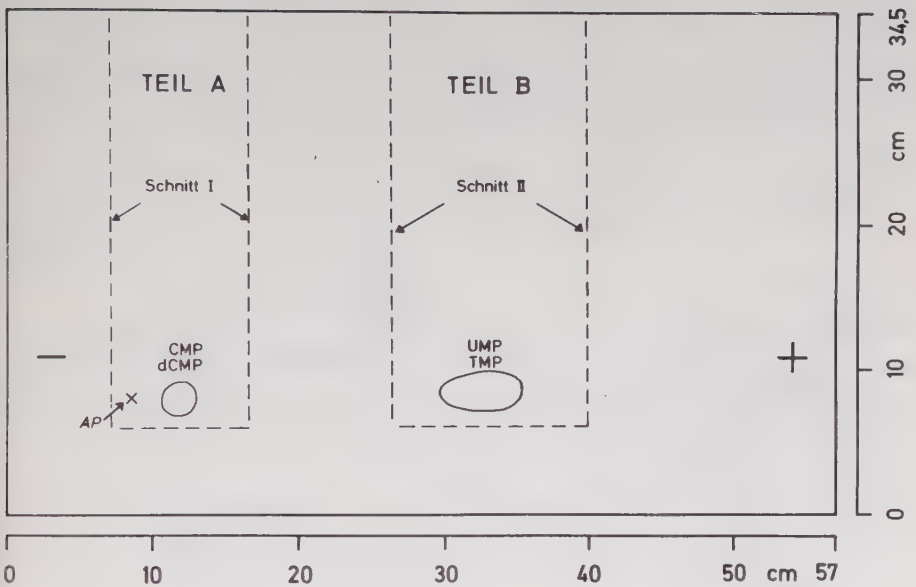

Abb. 1 a - c:

Trennung der Pyrimidinnucleotide durch kombinierte Anwendung der Hochspannungselektrophorese und Papierchromatographie.

Abb. 1 a: Hochspannungselektrophorese: Papier: MACHERY und NAGEL 2214 ff, 345 x 570 mm. Puffer: Essigsäure-Natriumacetat-Puffer nach WALPOLE 0,6 m, pH 3,6, Spannung 2,4 kV, Temperatur 0 - 2°C, Laufzeit 5 h. Auftragspunkt AP 8 cm vom unteren und 8 cm vom linken Blattrand (Kathode) entfernt. Auftragung von 20 µl der zu trennenden Substanzen in AP. Zu 20 µl jeweils 50 µg nicht markierter Monophosphate als Leitsubstanzen. Identifizierung mit UV-Licht (254 nm).

Abkürzungen: CMP = Cytidin-5'-Monophosphat, dCMP = Desoxycytidin-5'-Monophosphat, UMP = Uridin-5'-Monophosphat, TMP = Thymidin-5'-Monophosphat.

Wanderungsgeschwindigkeit auf (ca. 31 mm vom Auftragspunkt entfernt) als TMP und UMP (ca. 245 mm vom Auftragspunkt entfernt) (siehe Abb. 1a).

2. Papierchromatographie: Die weitere Auftrennung der beiden Gruppen erfolgte mittels Papierchromatographie, wozu entsprechende Abschnitte aus dem Pherogramm ausgeschnitten wurden (siehe Abb. 1a).

Die Trennung der Monophosphate beider Gruppen geschah im aufsteigenden System bei Verwendung des gleichen Fliessmittels: Essigsäureäthylester : Ameisensäure : Wasser im Verhältnis 60/13/27,v/v/v/, obere Phase. Es wurde fraktioniert chromatographiert mit Laufzeiten von 2, 5 und 15 h (Ergebnisse siehe Abb. 1b und c).

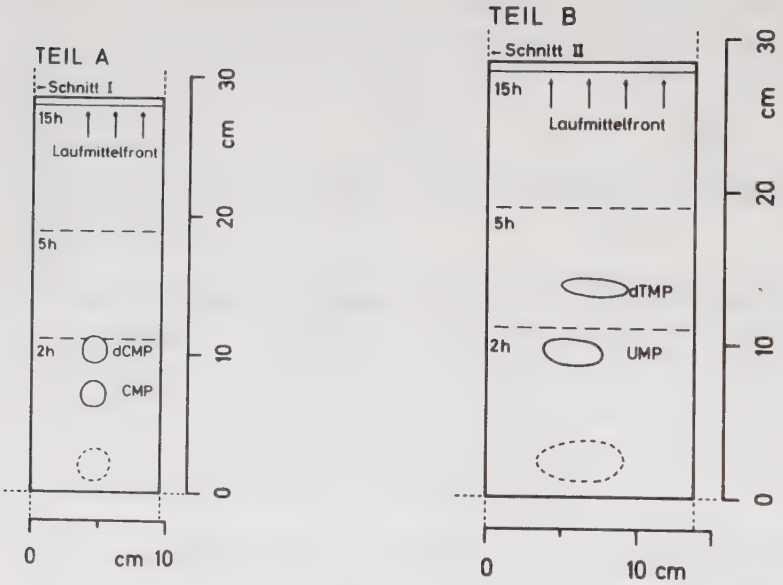

Abb. 1 b: Papierchromatographie: Teil A (nach Schnitt I) des Elektropherogramms (siehe Abb. 1a). Laufmittel: Essigsäureäthylester : Ameisensäure : Wasser im Verhältnis 60/13/27 (v/v/v) obere Phase aufsteigendes System. Fraktionierte Chromatographie mit den Laufzeiten 2 und 5 und 15 h.
Ergebnis: Trennung von dCMP und CMP

Abb. 1c: Papierchromatographie: Teil B des Elektropherogramms (nach Schnitt II). Fraktionierte Chromatographie unter den gleichen Bedingungen wie bei Trennung der Substanzen in Abb. 1 b.
Ergebnis: Trennung von TMP und UMP.

VI. ^{3}H-Aktivitätsmessungen

Zellsuspensionen, Medien oder DNS-Extrakte wurden auf 2 x 5 cm grosse Streifen von Filtrierpapier mit einer Mikropipette "MARBURG"

(EPPENDORF-GERAETEBAU, Hamburg) aufgetropft. Im allgemeinen wurden 20 µl, gelegentlich mehrfach 50 µl aufgetragen. Nach der Trocknung wurden die auf Platinnetzen befestigten Papierstreifen im Erlenmeyer-Kolben (1 l) in reinem Sauerstoff restlos verascht. Die Kolben wurden sodann mit 15 ml einer Scintillationsflüssigkeit (Zusammensetzung: POPOP 0, 789 g, PPO 30 g, Toluol 3,0 l und absoluter Alkohol 1,98 l) gefüllt und geschüttelt. Abschliessend erfolgte die Messung mit dem Flüssigkeitsscintillationsspektrometer "MARK I", Modell 6860, NUCLEAR-CHICAGO.

Der Quench-Effekt wurde durch kombinierte Anwendung eines "externen Standard" und der "Kanalverhältnis-Methode" ermittelt. Die gemessenen Impulse wurden in Zerfälle pro Minute umgerechnet. Die Bestimmung der ^{3}H-Aktivität der getrennten Monophosphate erfolgte auf entsprechende Weise. Die identifizierten Substanzflecken wurden mit Bleistift umrandet und in einer Entfernung von mehr als 3 mm ausserhalb der Umrandung ausgeschnitten und verascht.

C. Versuchsdurchführung und Ergebnisse

Die Untersuchungen zur Verwertung der Pyrimidinnucleoside für die Nucleinsäuren haben die Kenntnisse verschiedener Grössen wie der Verdoppelungszeit, des Trockengewichtes und des DNS-Gehaltes von C. albicans zur Voraussetzung, über deren Bestimmung zunächst in den Abschnitten I - III berichtet werden soll.

I. Die Bestimmung der Verdoppelungszeit von C. albicans

1. Zellvermehrung von C. albicans auf festem Nährboden (SABOURAUD): Petrischalen mit festem Nährboden wurden mit 1,0 ml einer Zellsuspension (= 8,25 x 10^7 Zellen) beimpft. 0, 3, 6, 12 und 24 h nach der Beimpfung wurden die Keime mit 14 ml physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmt und gezählt. Pro Zeitpunkt wurden 5 Petrischalen verwendet.

Die Zellen vermehrten sich von 0 - 3 h nur geringfügig (um ca. 25 %). Um 6 h hatte sich die Zahl gegenüber 3 h vervierfacht, und zwischen 6 und 12 h verzehnfachte sich die Zahl der Zellen. In den anschliessenden 12 h, also bis 24 h, erfolgte dann lediglich noch einmal eine Verdoppelung der Zellzahl. (Ergebnisse siehe Abb. 2)

2. Zur Vermehrung von C. albicans in flüssigem Nährmedium: Die Zellkonzentration betrug zu Beginn 2,75 x 10^5/ml. Die Zählungen erfolgten ebenfalls bei 0, 3, 6, 12 und 24 h.

Es zeigte sich hier, dass 3 h nach Versuchsbeginn annähernd eine Verdoppelung stattgefunden hatte und innerhalb weiterer 3 h (also zwischen 3 und 6 h) eine Vermehrung um das Zehnfache eingetreten war. In den nachfolgenden 6 h (also zwischen 6 und 12 h) nahm die Zellzahl nur um das Fünffache zu. Zwischen 12 und 24 h erfolgte sodann nur noch eine geringe Vermehrung um ca. 70 %. (Ergebnisse siehe Abb. 3)

3. Die Berechnung der Verdoppelungszeit (T): Diese wurde aus den Zählergebnissen zu den verschiedenen Zeitpunkten zwischen 0 und 24 h vorgenommen. Das exponentielle Wachstum lässt sich durch die folgende Gleichung ausdrücken:

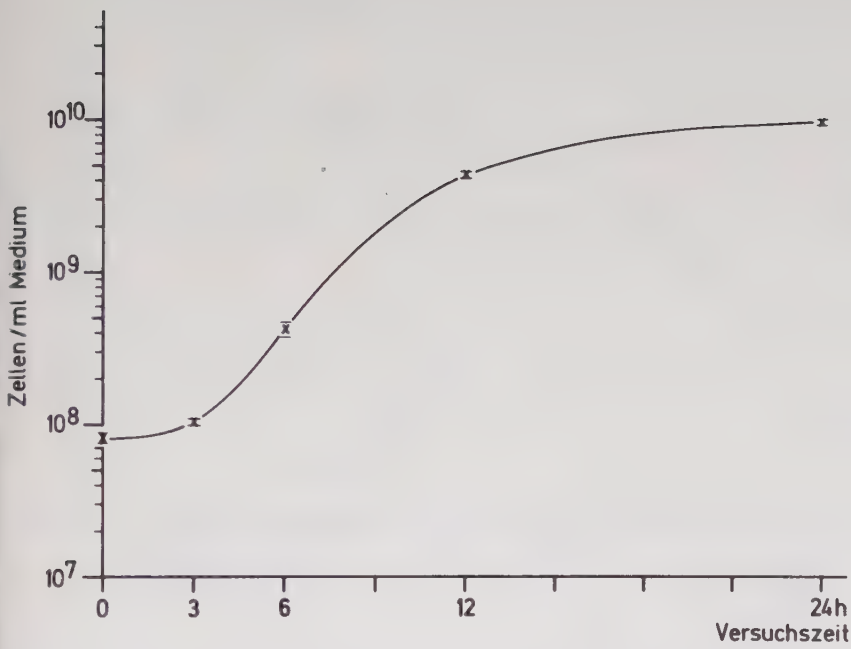

Abb. 2: Zellvermehrung von Candida albicans auf festem Nährboden (SABOURAUD). Beimpfung des Nährbodens mit 1,0 ml einer Zellsuspension (= 8,25 x 10^7 Zellen). Zellzählungen bei Aussaat sowie nach 3, 6, 12 und 24 h. Anzahl der ausgewerteten Messpunkte bei jeder Versuchszeit = 5. Einfache Standardabweichung.

$$(I) \qquad n_t = n_o \cdot 2^{\frac{t}{T}} \qquad \text{(LENNARTZ und MAURER, 1964)}$$

Dabei ist t ein beliebiger Zeitpunkt nach Null, n_t die Zellzahl zu diesem Zeitpunkt und n_o die Zellzahl zum Zeitpunkt Null, T die Generationszeit. Wird der Exponent $\frac{t}{T} = 1$ (sind also t und T gleich gross), so liegt eine Verdoppelung innerhalb des Zeitraumes zwischen Null und t vor.

Von Interesse ist hier die Zeitspanne, in der eine Verdoppelung der Zellzahl stattfindet. Die Berechnung von T geschieht nach der aus (I) abzuleitenden Gleichung

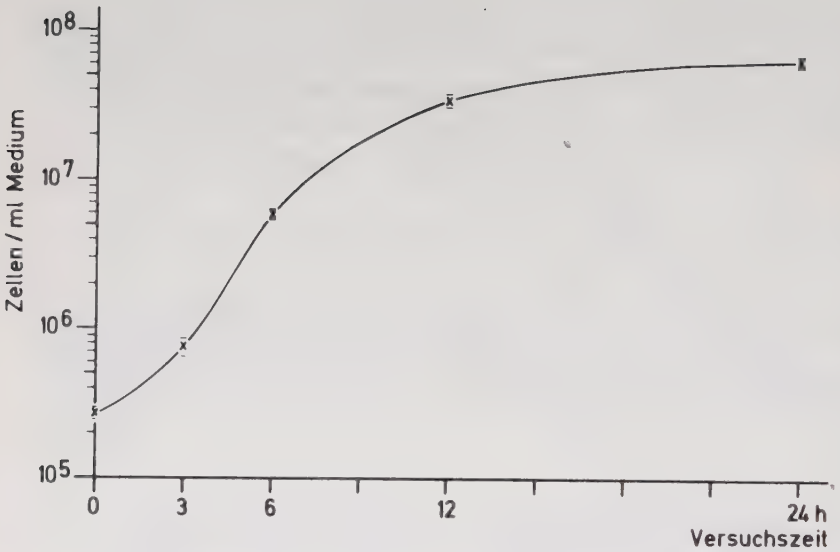

Abb. 3: Zellvermehrung von Candida albicans in flüssigem Nährmedium. Zellzählungen zu Versuchsbeginn sowie nach 3, 6, 12 und 24 h. Zellkonzentration zu Versuchsbeginn = $2{,}75 \times 10^5$ Zellen/ml. Anzahl der Messpunkte pro Zeitpunkt = 5. Einfache Standardabweichung.

$$(II) \qquad T = \frac{t \times \log 2}{\log \frac{n_t}{n_o}}$$

T kann demnach für beliebige Intervalle zwischen den Zeitpunkten, zu denen Zellzahlbestimmungen vorgenommen wurden, errechnet werden. Diese Ergebnisse sind in der Abbildung 4 zusammengefasst. Aus dem Kurvenverlauf ist zu ersehen, dass T bei festen Nährböden zunächst grösser ist als im flüssigen Medium, wobei das kleinste T schon sehr bald erreicht wird. Dieses T wurde im flüssigen Medium mit ca. 1 h, auf festen Nährböden mit ca. 1,5 h errechnet.

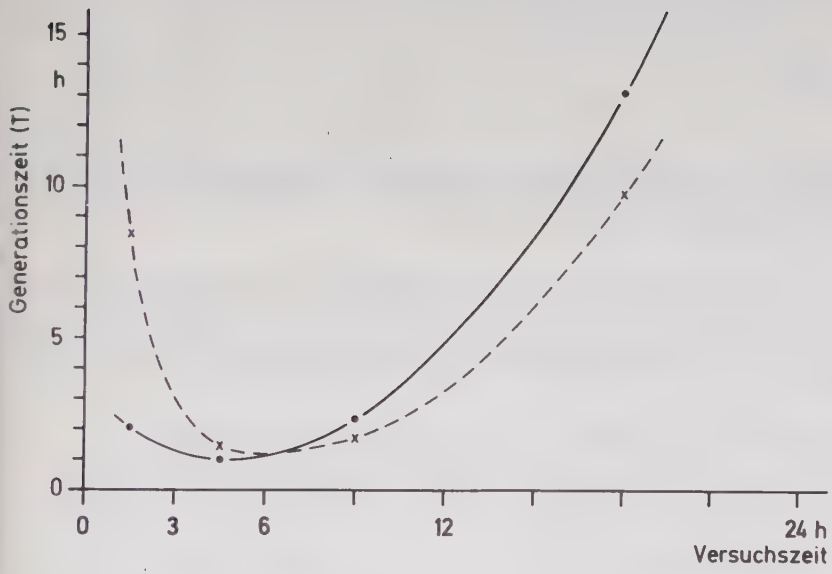

Abb. 4: Generationszeiten von Candida albicans zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Zellaussaat auf festem Nährboden und in flüssigem Nährmedium. Die Berechnung der Generationszeit (T) erfolgte für die Intervalle zwischen den Zeitpunkten, zu denen Zellzahlbestimmungen vorgenommen wurden. Die Symbole bedeuten die Zeitpunkte, zu denen Zellzählungen durchgeführt wurden: ●————● Verdoppelungszeit in flüssigem Nährmedium; x---------x Verdoppelungszeit auf festem Nährmedium (SABOURAUD).

II. Die Bestimmung des Trockengewichtes von C. albicans

2 000 ml flüssigen Nährmediums wurden mit Zellen von einer Stammplatte beimpft. Nach 24 h erfolgte die Zellzahlbestimmung, wobei > 10 000 Zellen ausgezählt wurden. Die Zellzahl betrug $4{,}71 \times 10^7$/ml. Das Gesamtvolumen wurde zentrifugiert und das Sediment nach dreimaliger Waschung bei ca. 90°C nachfolgend im Exsikkator getrocknet sowie gewogen. Das Gewicht betrug 1,85 g.

Aus diesem und der Gesamtzellzahl ergab sich ein Trockengewicht der Einzelzelle C. albicans von $1{,}95 \times 10^{-11}$ g.

III. Die Bestimmung des DNS-Gehaltes von Candida albicans

5 ml einer Zellsuspension (Zellzahl zu Versuchsbeginn $6{,}63 \times 10^7$/ml)

wurden über 4 h bei 30°C gehalten. Die Zellzahlbestimmung, durch Auszählung von > 10 000 Zellen, ergab 1,38 x 10^8 Zellen/ml. T betrug zu diesem Zeitpunkt 3, 8 h. Die extrahierte Gesamtmenge der DNS betrug 10,72 x 1 560 µg bei einer Gesamtzellzahl von 6,97 x 10^{10}.

Demnach ergibt sich ein mittlerer DNS-Gehalt der Einzelzelle von 2,416 x 10^{-13} g.

IV. Verwertung von Pyrimidin-Nucleosiden und -desoxynucleosiden für die Nucleinsäuren von Candida albicans

Hauptgegenstand dieser Untersuchungen ist die Verwertung der Nucleoside Cytidin und Uridin, Thymidin, Desoxycytidin und Desoxyuridin für die Nucleinsäuren von Candida albicans. Es wurde die Markierungsform "generally labeled" verwendet, nur in einem Falle daneben auch noch CdR-5T.

Die Inkubation der Vorläufer erfolgte in allen Fällen über einen Zeitraum von 4 h hinweg. Die Zellzahl betrug zu Versuchsbeginn maximal 7 x 10^7 Zellen/ ml, wodurch erreicht werden sollte, dass sich die Zellen innerhalb der Inkubationszeit logarithmisch vermehrten.

Nachdem Vorversuche gezeigt hatten, dass die Pyrimidinriboside nur in sehr geringer Menge inkorpiert werden, wurden hohe ^{3}H-Aktivitäten verwendet (7,93 - 16,0 mC/ml). Die markierten Vorläufer standen mit unterschiedlichen spezifischen Aktivitäten zwischen 2 170 und 15 700 mC/mMol zur Verfügung, wobei die verwendeten Konzentrationen zwischen 0,041 und 7,01 x 10^{-3} mMol lagen. Die Volumina der Zellsuspensionen betrugen zwischen 246 und 500 ml.

Zu Beginn und am Ende der Inkubationszeiten wurden Zellzählungen vorgenommen. Aus der Zunahme der Zellzahl konnte die Menge neusynthetisierter Nucleinsäure innerhalb der Inkubationszeit ermittelt werden. Diesen Berechnungen wurde ein DNS-Gehalt von 2,41 x 10^{-13} g/Zelle (siehe auch C III) und ein RNS-Gehalt von 5,0 x 10^{-13}g/Zelle zugrunde gelegt (nach DASTIDAR, 1966).

Nach Beendigung der Inkubation wurden die Suspensionen rasch abgekühlt, zentrifugiert und die Sedimente verarbeitet (Extraktion der Nucleinsäuren, enzymatische Auftrennung). Durch Messung der ^{3}H-Aktivität der isolierten Monophosphate wurde die prozentuale Verteilung der ^{3}H-Aktivität auf die isolierten Pyrimidinnucleoside festgestellt und durch Messung der Gesamtaktivität der extrahierten Nucleinsäuren bei bekannter spezifischer Aktivität der Vorläufer die Gesamtmenge der innerhalb der Inkubationszeit in die Nucleinsäuren eingebauten Vorläufer bestimmt. Bei Kenntnis der prozentualen Verteilung der ^{3}H-Aktivität auf die isolierten Nucleoside sowie bei Kenntnis der Gesamtmenge der in die Nucleinsäure eingebauten Vorläufer konnten sodann die auf die einzelnen Monophosphate der beiden Nucleinsäuren entfallenden inkorporierten Vorläufermengen berechnet werden. Diese wurden in Beziehung gesetzt zu den innerhalb des Versuchszeitraumes neugebildeten Mengen von Monophosphaten,

wobei für die DNS ein Basenverhältnis von 35,1 : 64,9 (Cytosin : Thymin) (STENDERUP and BAK, 1968) und die RNS von 1 : 1 (Cytosin : Uracil) zugrundegelegt wurde. Auf diese Weise war annähernd die Bestimmung der prozentualen Beteiligung des verabreichten Vorläufers an der Neusynthese des jeweiligen Monophosphates möglich.

Besondere Verhältnisse liegen bei der Verwendung des ^{3}H-TdR vor. Hier zeigt es sich, dass dieser Vorläufer in nur äusserst geringer Menge inkorporiert wird. Deshalb wurden mit diesem Vorläufer besondere Untersuchungen durchgeführt (siehe C/V).

1. Die Verwertung von ^{3}H-CdR-(5-T):

Das ^{3}H-CdR-(5-T) ("RADIOCHEMICAL CENTER, AMERSHAM", MASS., U.S.A.; spez. Aktivität 15 700 mC/mMol) wurde mit einer Aktivität von 6,96 µC/ml Medium angewendet, wobei die Konzentration des CdR 0,10 µg/ml bzw. 0,44 x 10^{-3} mMol/ml betrug. Es wurden 500 ml Suspension mit einer Zellkonzentration von 5,06 x 10^{7} Zellen/ml zu Versuchsbeginn angewendet. Bei Beendigung der Inkubation betrug die Zellzahl 9,34 x 10^{7} Zellen/ml. Die mittlere Verdoppelungszeit (T) lag demnach bei 4,25 h.

Aus dem Zellzuwachs wurde eine Menge neugebildeter DNS von 5,15 x 10^{-3} g und neugebildeter RNS von 10,7 x 10^{-3} g berechnet. Die Gesamtmenge des verabreichten Vorläufers betrug 50,5 x 10^{-6} g; in die Nucleinsäuren wurde dabei eine Gesamtmenge von 0,834 x 10^{-6} g eingebaut. Der prozentuale Anteil des verabreichten, in die Nucleinsäuren eingebauten Vorläufers machte somit 1,7 % aus. - Die weiteren Ergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt.

2. Die Verwertung von ^{3}H-CdR-(G):

Das ^{3}H-CdR-(G) ("NEW ENGLAND NUCLEAR CORPORATION", Boston, Mass., U.S.A.; spez. Aktivität 7 200 mC/mMol) wurde mit einer Aktivität von 15,07 µC/ml angewandt, wobei die Konzentration des Vorläufers 0,475 µg/ml bzw. 2,07 x 10^{-3} mMol/ml betrug. Es wurde eine Suspension von 250 ml mit einer Zellzahl von 3,95 x 10^{7} /ml zu Versuchsbeginn verwendet. Nach Beendigung der vierstündigen Inkubationszeit betrug die Zellzahl 7,45 x 10^{7}/ml. Die errechnete mittlere Verdop-

Tabelle 1

Vorläufer: ^{3}H-CdR-(5-T)

Pyrimidinnucleotide	TMP	dCMP	UMP	CMP
Prozentuale Verteilung der gemessenen ^{3}H-Aktivität:	—	1,53	74,0	24,5
Menge des inkorporierten Vorläufers als Nucleotid in g [x 10^{-8}]:	—	1,72	88,3	29,0
Menge der neugebildeten Nucleotide in g [x 10^{-3}]:	—	0,851	2,53	2,55
Prozentuale Beteiligung des Vorläufers an neugebildeten Nucleotiden [%]:	—	0,002'0	0,035	0,011

pelungszeit (T) war 4,37 h.

Aus dem Zellzuwachs war eine Menge neugebildeter DNS mit 2,11 x 10^{-3}g und die Menge neugebildeter RNS mit 4,38 x 10^{-3}g zu errechnen. Die Gesamtmenge des verabreichten Vorläufers war 119 x 10^{-6}g, wobei in die Nucleinsäuren eine Gesamtmenge von 0,991 x 10^{-6}g eingebaut wurde. Danach beträgt der prozentuale Anteil des verabreichten, in die Nucleinsäuren eingebauten Vorläufers 0,83 %. - Die weiteren Ergebnisse sind in Tabelle 2 dargestellt.

3. Die Verwertung von ^{3}H-Cytidin-(G):

Das ^{3}H-Cytidin-(G) ("NEW ENGLAND NUCLEAR CORPORATION", Boston, Mass., U.S.A.; spez. Aktivität 5 870 mC/mMol) wurde mit einer Aktivität von 13,99 µC/ml Medium angewandt. Dabei betrug die Konzentration des Vorläufers 0,58 µg/ml bzw. 2,38 x 10^{-3}mMol/ml. Das Volumen der inkubierten Suspension betrug 246 ml mit einer Zellkonzentration von 4,09 x 10^{7} /ml. Bei Beendigung der Inkubation lagen 6,16 x 10^{7}Zellen/ml vor. Die errechnete Verdoppelungszeit (T) betrug 6,77 h.

Tabelle 2

Vorläufer: ^{3}H-CdR-(G)

Pyrimidinnucleotide	TMP	dCMP	UMP	CMP
Prozentuale Verteilung der gemessenen ^{3}H-Aktivität:	0,548	1,18	77,6	20,7
Menge des inkorporierten Vorläufers als Nucleotid in g [x10^{-6}]:	0,771	1,58	110,1	29,1
Menge der neugebildeten Nucleotide in g [x10^{-3}]:	0,675	0,348	1,04	1,04
Prozentuale Beteiligung des Vorläufers an neugebildeten Nucleotiden [%]:	0,001'1	0,004'5	0,11	0,028

Aus dem Zellzuwachs während der Inkubationszeit wurde die Menge neugebildeter DNS mit 1,23 x 10^{-3}g und die Menge neugebildeter RNS mit 2,55 x 10^{-3}g berechnet. Bei einer Gesamtmenge des verabreichten Vorläufers von 142 x 10^{-6}g betrug die Gesamtmenge des in die Nucleinsäuren eingebauten Vorläufers 11,7 x 10^{-6}g. Der prozentuale Anteil des verabreichten, in die Nucleinsäuren eingebauten Vorläufers machte somit 8,2 % aus. - Die weiteren Ergebnisse sind in Tabelle 3 dargestellt.

4. Die Verwertung von ^{3}H-UdR-(G):

Das ^{3}H-UdR-(G) ("NEW ENGLAND NUCLEAR CORPORATION", Boston, Mass., U.S.A.; spez. Aktivität von 2 170 mC/mMol) wurde mit einer Aktivität von 15,23 µC/ml Medium angewandt. Danach betrug die Konzentration des Vorläufers 1,60 µg/ml bzw. 7,01 x 10^{-3}mMol/ml bei einem Volumen der inkubierten Suspension von 250 ml. Zu Versuchsbeginn lag eine Konzentration von 3,93 x 10^{7}Zellen/ml vor. Bei Beendigung der Inkubation betrug die Zellzahl 7,93 x 10^{7}Zellen/ml. Die errechnete Verdoppelungszeit (T) betrug 4,25 h.

Tabelle 3

Vorläufer: ^{3}H-Cytidin-(G)

Pyrimidinnucleotide	TMP	dCMP	UMP	CMP
Prozentuale Verteilung der gemessenen ^{3}H-Aktivität:	0,137	5,11	15,1	79,6
Menge des inkorporierten Vorläufers als Nucleotid in g [x10^{-8}]:	2,11	75,3	235,0	1240,0
Menge der neugebildeten Nucleotide in g [x10^{-3}]:	0,394	0,203	0,604	0,607
Prozentuale Beteiligung des Vorläufers an neugebildeten Nucleotiden [%]:	0,005'4	0,37	0,39	2,0

Aus dem Zellzuwachs während der Inkubationszeit wurde eine Menge neugebildeter DNS von 2,18 x 10^{-3}g und eine Menge neugebildeter RNS mit 4,51 x 10^{-3}g berechnet. Bei einer Gesamtmenge des verabreichten Vorläufers von 400 x 10^{-6}g betrug die Gesamtmenge des in die Nucleinsäuren eingebauten Vorläufers 0,206 x 10^{-6}g. Der in die Nucleinsäuren eingebaute prozentuale Anteil machte demnach 0,052 % aus. - Die weiteren Ergebnisse sind in der Tabelle 4 dargestellt.

5. Die Verwertung von ^{3}H-Uridin-(G):

Das ^{3}H-Uridin-(G) ("NEW ENGLAND NUCLEAR CORPORATION", Boston, Mass., U.S.A.; spez. Aktivität 15 100 mC/mMol) wurde mit einer Aktivität von 15,12 µC/ml Medium verwendet. Die Konzentration des Vorläufers betrug 0,244 µg/ml bzw. 0,98 x 10^{-3}mMol/ml. Das Volumen der inkubierten Suspension war 246 ml. Zu Versuchsbeginn lagen 3,96 x 10^{7} Zellen/ml vor. Bei Beendigung der Inkubation betrug die Zellzahl 6,11 x 10^{7} Zellen/ml. Die Verdoppelungszeit (T) der Zellen war 6,25 h.

Aus dem Zellzuwachs während der Inkubationszeit wurde die Menge neu-

Tabelle 4

Vorläufer: ^{3}H-UdR-(G)

Pyrimidinnucleotide	TMP	dCMP	UMP	CMP
Prozentuale Verteilung der gemessenen ^{3}H-Aktivität:	5,12	4,75	76,3	13,8
Menge des inkorporierten Vorläufers als Nucleotid in g [x10^{-8}]:	1,48	1,32	22,3	4,03
Menge der neugebildeten Nucleotide in g [x10^{-3}]:	0,697	0,360	1,07	1,07
Prozentuale Beteiligung des Vorläufers an neugebildeten Nucleotiden [%]:	0,002'1	0,003'7	0,021	0,003'8

gebildeter DNS mit 1,28 x 10^{-3}g und die Menge neugebildeter RNS mit 2,65 x 10^{-3}g berechnet. Bei einer Gesamtmenge des verabreichten Vorläufers von 60 x 10^{-6}g wurde in die Nucleinsäuren eine Gesamtmenge von 20,1 x 10^{-6}g eingebaut. Der prozentuale Anteil des verabreichten, in die Nucleinsäuren eingebauten Vorläufers betrug demnach 33,5 %. - Die weiteren Ergebnisse sind in Tabelle 5 dargestellt

V. Untersuchungen zur Verwertung von ^{3}H-Thymidin für die Nucleinsäure-Synthese von Candida albicans

1. Biochemische Untersuchungen:

Nachdem Vorversuche ergeben hatten, dass ^{3}H-TdR offenbar nur in äusserst geringen Mengen von C. albicans inkorporiert wird, wurden Untersuchungen mit einer sehr grossen Zellzahl/Volumeneinheit durchgeführt. Ueber Nacht bei 30°C in Suspension gehaltene Zellen wurden zu Versuchsbeginn in 5 000 ml flüssigen Nährmediums überführt (Zelldichte: 2,41 x 10^{7}Zellen/ml) und 2,5 mC ^{3}H-TdR (= 0,44 µC/ml) mit einer spezifischen Aktivität von 10 100 mC/mMol hinzugefügt. Die TdR-Konzentration im Nährmedium betrug dabei 0,01 µg/ml oder 0,0041 x 10^{-3}mMol.

Nach einer Inkubationszeit von 1 h 45' wurde ein aliquoter Teil zur Zellzahlbestimmung entnommen und die Kultur rasch abgekühlt. Die

Tabelle 5

Vorläufer: ^{3}H-Uridin (G)

Pyrimidinnucleotide	TMP	dCMP	UMP	CMP
Prozentuale Verteilung der gemessenen ^{3}H-Aktivität:	0,32	1,28	76,2	22,2
Menge des inkorporierten Vorläufers als Nucleotid in g [x10^{-8}]:	8,49	32,5	2040,0	589,0
Menge der neugebildeten Nucleotide in g [x10^{-3}]:	0,410	0,211	0,627	0,631
Prozentuale Beteiligung des Vorläufers an neugebildeten Nucleotiden [%]:	0,020	0,15	3,3	0,93

Nucleinsäuren wurden extrahiert. Die Menge der neugebildeten DNS betrug 101,9 x 10^{-5}mg bei einer Verdoppelungszeit von 3,25 h. Es wurde jeweils 1,18 mg der extrahierten Nucleinsäure verbrannt und deren ^{3}H-Aktivität gemessen. Die Messergebnisse lagen nur knapp über dem Nulleffekt des Zählgerätes und waren nicht verwertbar.

Bei einem weiteren Versuch wurde von einem kleineren Volumenansatz mit einer höheren Zellzahl ausgegangen. In 500 ml frischem Nährmedium wurden Zellen, die über Nacht in flüssigem Nährmedium bei 30°C gehalten worden waren, überführt. Die ^{3}H-Aktivität betrug 8,01 µC/ml Medium. Bei einer spezifischen Aktivität von 10 100 mC/mMol lagen 0,19 µg oder 0,78 x 10^{-3}mMol TdR/ml vor. Die Inkubationszeit betrug 4 h. Die Zellzahlbestimmungen zu Versuchsbeginn und zu Versuchsende ergaben 6,6 x 10^7 und 13,8 x 10^7Zellen/ml Medium. Die Verdoppelungszeit (T) betrug im Mittel 3,75 h. Die anschliessende Aktivitätsbestimmung der extrahierten Nucleinsäuren ergab nach Verbrennung von jeweils 250 µl eine mittlere dpm-Zahl von 1 630. Dabei wurden jeweils etwa 0,39 mg DNS verbrannt und gemessen.

Die Menge neugebildeter DNS während des Versuchs betrug 8,77 x 10^{-3}g, die neugebildete Thymidylsäure 2,16 x 10^{-3}g. Die inkorportierte Vorläufermenge war 2,50 x 10^{-9}g. Die prozentuale Beteiligung des im Medium angebotenen ^{3}H-TdR an der während des Versuchs neugebildeten Thymidylsäure betrug demnach 0,00012 %.

2. Autoradiographische Untersuchungen:

Nachdem die oben dargestellten Untersuchungen keine sicheren Feststellungen über einen Einbau von ^{3}H-TdR in die DNS erlaubten, wurde versucht, die ^{3}H-TdR-Aufnahme autoradiographisch nachzuweisen. Dabei wurde ^{3}H-TdR mit hoher Aktivität und hoher spezifischer Aktivität verwendet. Diese Versuche sollten Aufschluss geben, ob die über den Zellen in den Autoradiogrammen sichtbaren Silberkörner tatsächlich von ^{3}H-TdR herrührten, das in die DNS eingebaut wurde.

a) Zur Entfernung säurelöslicher ^{3}H-TdR-Derivate aus C. albicans: Zunächst war die Frage zu klären, ob die nach ^{3}H-TdR-Inkubation in den Zellen nachweisbare ^{3}H-Aktivität in Form säurelöslicher Bestandteile vorliegt oder fest in die DNS eingebaut ist.

Einer Zellsuspension wurde ^{3}H-TdR (spez. Aktivität 16 400 mC/mMol) hinzugefügt, wonach eine Aktivität von 50 μC/ml und eine TdR-Konzentration von 0,737 μg/ml bzw. 3,046 x 10^{-3}mMol vorlag. Die Zellzahl betrug bei Versuchsbeginn 1,74 x 10^6Zellen und nach einer Inkubationszeit von 8 h 4,06 x 10^7Zellen/ml. Nach mehrfacher Waschung der Zellen in physiologischer Kochsalzlösung wurden diese auf Objektträger aufgetropft. Vor der Herstellung der Autoradiogramme wurden die Präparate wie folgt behandelt:

1. TCE-Lösung 1, 2, 4 und 8 h, wässern 1,5 h
2. TCE-Lösung 1, 2, 4 und 8 h, wässern 1 h,
   TdR-Lösung (inaktiv) 3 h, wässern 1,5 h.

Die Ergebnisse der Silberkornauszählungen nach den Waschvorgängen sind in der Tabelle 6 dargestellt; sie zeigen: Die Waschung in TCE-Lösung führte zu keiner signifikanten Abnahme der Silberkornzahl. Die Waschungen in TCE-Lösung und nachfolgend in TdR-Lösung (0,05 %-ig) ergaben eine geringfügige Abnahme der Silberkornzahl. Zum Vergleich der Zählergebnisse wurde der t-Test herangezogen, wobei die Gegenüberstellung der Werte nach einstündiger und achtstündiger Waschung in TCE mit nachfolgender Waschung in TdR-Lösung ein $p < 0,05$ ergab.

b) Das Verhalten von Candida albicans in physiologischer NaCl-Lösung mit und ohne Thymidin: Diese Untersuchungen sollten insbesondere dazu dienen, die Frage zu klären, ob bei einem Sistieren des Wachstums die autoradiographisch nachgewiesene ^{3}H-Aktivität in den Zellen eine Veränderung erfährt.

Tabelle 6

Dauer der Waschung in TCE-Lösung (Stunden)	SkZ/mK Waschung in TCE-Lösung 5 %-ig	SkZ/mK Waschung in TCE-Lösung 5 %-ig und in TdR-Lösung 0,05 %-ig, 3h
(1)	(2)	(3)
1	$0,71_3$ (±0,045)	$0,75_4$ a) (±0,065)
2	$0,70_1$ (±0,064)	$0,72_1$ (±0,051)
4	$0,68_2$ (±0,052)	$0,70_9$ (±0,078)
8	$0,68_0$ (±0,054)	$0,68_7$ a) (±0,032)

SkZ/mK = mittlere Silberkornzahl/markierte Zelle, umgerechnet auf eine Expositionszeit von 1 d.

Bei Waschung in TCE-Lösung (2) anschliessende Wässerung 1,5 h . - Bei Waschung in TCE-Lösung und TdR-Lösung (3): Nach TCE-Lösung Wässerung 1 h sowie nach TdR-Lösung 1,5 h.

a) t-Test: $p < 0,05$

Von der Suspension des vorangegangenen Versuches wurden nach beendeter radioaktiver Inkubation Zellen durch Zentrifugation gewonnen, gewaschen und in physiologischer Kochsalzlösung ohne bzw. mit Zusatz nicht-markierten Thymidins (5 µg TdR/ml) überführt. Diese Suspensionen wurden 4 Tage bei 20°C gehalten. Wachstumskontrollen erfolgten durch Zellzählungen zu Beginn sowie nach dem 1., 2. und 4. Tage. Gleichfalls wurden zu den genannten Zeitpunkten geringe Mengen der Suspension auf Objektträger aufgetropft und nach der üblichen Waschung (siehe allgemeine Methodik) Autoradiogramme hergestellt. Nach jeder Entnahme erfolgte Zentrifugation und Auffüllung der Lösung auf das Ausgangsvolumen, wobei die TdR-Konzentration konstant

gehalten wurde. Die Zellzahl der Suspension verringerte sich infolge der Entnahme für die Zellzählung und die Herstellung von Autoradiogrammen. Das wurde berücksichtigt, indem Zellzählungen jeweils vor und nach der Zentrifugation vorgenommen wurden.

Die Ergebnisse der Zellzählungen sind in den Abbildungen 5 a und b dargestellt. Sie zeigen, dass die Zellzahl in physiologischer Kochsalzlösung keine erfassbare Zunahme zeigt; dagegen führt der Zusatz von nicht-markiertem TdR zu einer Vermehrung der Zellzahl. Am 1. Tag war eine Vermehrung um 7,64, am 2. Tag um 15,0 und am 4. Tag um 16,2 % eingetreten. Die Prüfung mit dem t-Test ergab für die Differenz zwischen dem Zeitpunkt 0 und dem 1. Tag und ebenso zwischen dem 1. und 2. Tag ein $p < 0,05$, für die Differenz zwischen dem Zeitpunkt 0 und dem 2. Tag ein $p < 0,001$. Zwischen dem 2. und 4. Tag war keine signifikante Zunahme mehr feststellbar.

In den Autoradiogrammen wurde sowohl die Silberkornzahl pro markierte Zelle (SkZ/mK) als auch der ^{3}H-Index, d.h. der Prozentsatz der markierten Zellen bezogen auf alle ausgezählten Zellen, bestimmt. Die errechnete Silberkornzahl pro Zelle (siehe Abb. 6) ist das Produkt aus SkZ/mK und ^{3}H-Index. Weiterhin wurde aus der Zellzahl/ml und der Silberkornzahl pro Zelle die "Silberkornzahl/ml" errechnet (Abb. 7). Wie aus Abb. 6 ersichtlich, nahm die Silberkornzahl pro Zelle nach Aufenthalt der Zellen in physiol. NaCl-Lösung ab. Eine eintägige Aufbewahrung der Zellen in dieser Lösung führte zu einer Verminderung der Silberkornzahl pro Zelle um ca. 25 % (t-Test: $p < 0,001$). Nach weiterem Aufenthalt der Zellen über 2 bzw. 4 Tage war eine weitere Abnahme der SkZ/Zelle feststellbar, wobei zwischen dem 1. und 2. Tag bzw. zwischen dem 2. und 4. Tag keine signifikanten Unterschiede feststellbar waren. Für die zwischen den am 2. und 4. Tag ermittelten Werte ergab sich ein $p < 0,05 > 0,01$. Die viertägige Aufbewahrung der Zellen hatte eine Abnahme der SkZ/Zelle um insgesamt ca. 32 % zur Folge. Nach Aufenthalt der Zellen in physiol. NaCl-Lösung, der Thymidin (5 µg/ml) zugesetzt war, zeigte sich eine entsprechende Verminderung der Silberkornzahl; jedoch nahm hier die SkZ/Zelle langsamer ab. Hier wurde nach viertägiger Aufbewahrung in der genannten Lösung gleichfalls eine Verminderung um 32 % festge-

stellt. Die Abnahme zwischen dem Zeitpunkt 0 und dem 1. Tag, zwischen dem 1. und 2. Tag sowie zwischen dem 2. und 4. Tag war stets signifikant ($p < 0{,}001$).

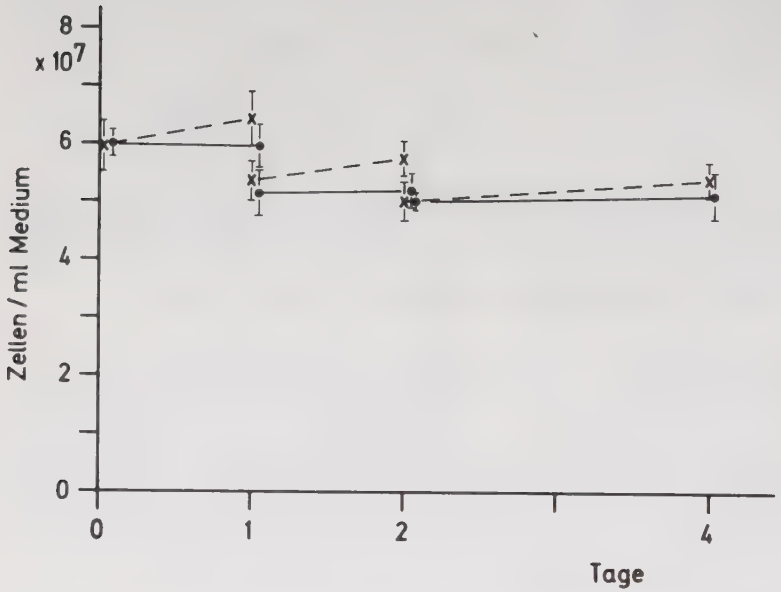

Abb. 5 a und b: Vermehrung von C. albicans in physiol. Kochsalzlösung mit und ohne Zusatz von inaktivem TdR (5 µg/ml) nach 8-stündiger Inkubation mit ^{3}H-TdR.

Abb. 5 a: ●————● Vermehrung von C. albicans in physiol. Kochsalzlösung, x--------x Vermehrung in physiol. Kochsalzlösung und TdR. Temperatur: 20°C. Zellzahlbestimmungen nach Beendigung der Inkubation sowie am 1., 2. und 4. Tag jeweils vor der Zentrifugation.

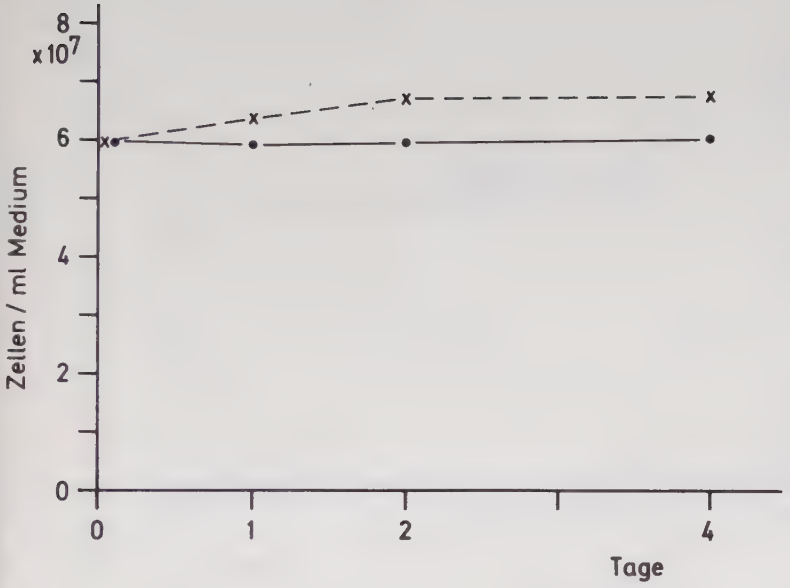

Abb. 5 b: Diese Kurven entsprechen den Ergebnissen in Abb. 5 a. Der infolge Waschung und Resuspension sowie Entnahme für Zellzählung und Herstellung von Autoradiogrammen eingetretene Verlust ist hier korrigiert. (●————● Vermehrung von C. albicans in physiol. Kochsalzlösung, x---------x Vermehrung in physiol. Kochsalzlösung mit TdR.)

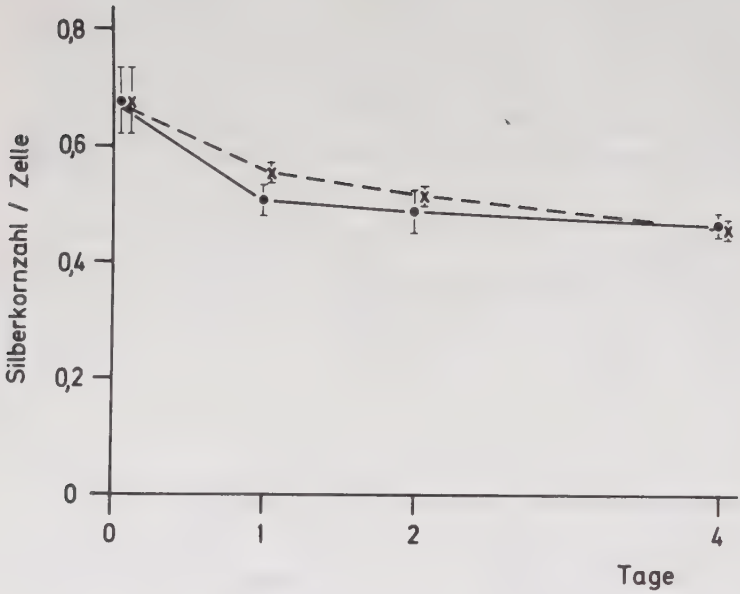

Abb. 6: Silberkornzahlen in den Autoradiogrammen: ●————● SkZ (Silberkornzahl/Zelle) nach Aufenthalt der Zellen in physiologischer Kochsalzlösung. x---------x Aufenthalt der Zellen in physiologischer Kochsalzlösung und TdR (5 µg/ml). Herstellung der Autoradiogramme nach Beendigung der radioaktiven Inkubation sowie nach dem 1., 2. und 4. Tage. Die SkZ pro Zelle ist das Produkt der Silberkornzahl pro markierte Zelle und dem Prozentsatz markierter Zellen.

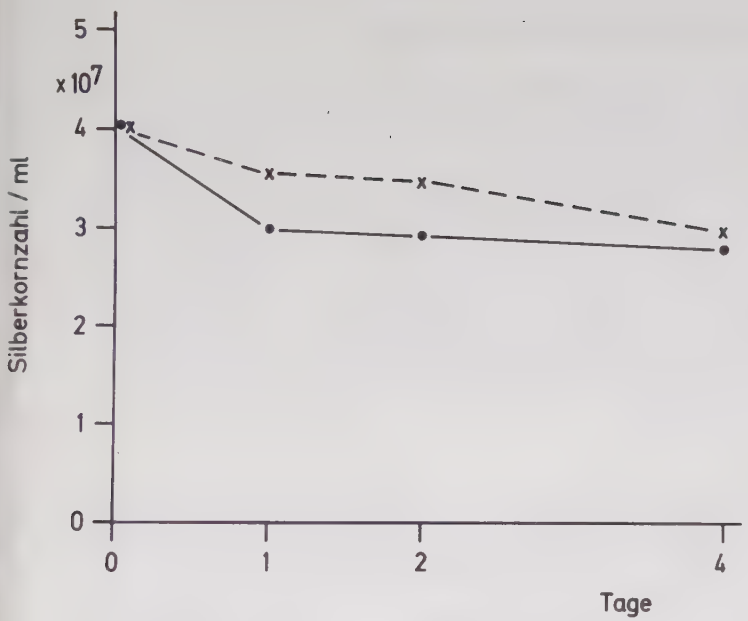

Abb. 7: Silberkornzahl der Autoradiogramme: ●————● Silberkornzahl/ml nach Beendigung der Inkubation bzw. nach Aufenthalt der Zellen in physiol. Kochsalzlösung zu den Zeitpunkten 1, 2 und 4 Tagen. x---------x SkZ/ml zu den gleichen Zeitpunkten nach Aufenthalt der Zellen in physiol. Kochsalzlösung + TdR (5 µg/ml). Die SkZ/ml ist das Produkt der SkZ/mk und der Zellen/ml zu den genannten Zeitpunkten.

D. DISKUSSION

I. Zur Verdoppelungszeit von Candida albicans

Zwischen der Verdoppelungszeit der Zellen und den in dieser Zeitspanne neugebildeten Nucleinsäuremengen dürften unabdingbare Beziehungen bestehen. Daher ist die Kenntnis der Verdoppelungszeit der Zellen auch eine Voraussetzung für die quantitative Bewertung der Ergebnisse von Einbauversuchen mit radioaktiv-markierten Nucleinsäure-Vorläufern.Es ist zu beachten, dass die Verdoppelungszeit von verschiedenen Faktoren, insbesondere von der Art des Mediums, von der vorgegebenen Zelldichte und von der Temperatur abhängig ist. Diese Voraussetzungen verdienen daher bei Einbauversuchen besondere Beachtung.

Die Untersuchungen dienten dazu, die Verdoppelungszeit zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Ansatz nicht-synchronisierter Kulturen von C. albicans kennenzulernen und den Zeitpunkt zu ermitteln, zu welchem dieser den kleinsten Wert annimmt, also die rascheste Zellvermehrung stattfindet. Es darf angenommen werden, dass im Stadium der exponentiellen Zellvermehrung der am Wachstum beteiligte Anteil der Kultur, die "growth fraction", 100 % beträgt oder zumindest nahe 100 % liegen dürfte. Unter dieser Voraussetzung dürfte die Verdoppelungszeit, d.h. jene Zeitspanne, die zur Verdoppelung der vorhandenen Zellmenge erforderlich ist, auch der Generationszeit (T) der Einzelzelle entsprechen. Zugleich ist unter diesen Bedingungen eine besonders intensive DNS-Synthese vorauszusetzen, wobei eine besonders hohe Inkorporationsrate im Medium angebotener radioaktiver Vorläufer der Nucleinsäuren zu erwarten ist.

Untersuchungen über die Verdoppelungszeit sind aus der Literatur nur von den C. albicans verwandten Hefearten bekannt. BURNS (1956) fand bei synchronisierten Kulturen von S. cerevisiae auf Schrägagarkulturen (2 % Glucose, 1 % Hefeextrakt (Difco-Präparat), 0,5 % Pepton und 2 % Agar) und bei Cryptococcus diffluens eine Verdoppelungszeit von 2 h. MITCHISON und WALKER (1959) stellten eine mittlere Generationszeit von 2,5 h bei Sch. pombe fest.

Die optimale Temperatur zur Vermehrung der Zellen in der sog. Hefeform liegt zwischen 28 und 30°C (BURNS, 1956; MITCHISON und WALKER, 1959; MÜLLER, KOEPPE und SCHIFF, 1967). Die hier dargelegten Untersuchungen wurden bei 30°C durchgeführt. Die Ergebnisse der Zellzählungen und die hieraus berechneten Verdoppelungszeiten lassen ein unterschiedliches Verhalten in flüssigem Medium und auf festen Nährböden erkennen. Auf festem Nährboden nimmt die Verdoppelungszeit erst nach einer lag-Phase langsam ab. Sie beträgt ca. 1,5 Stunden nach Ansatz der Kultur noch über 8 h; erst 6 Stunden nach dem Ansatz wird eine minimale Verdoppelungszeit von ca. 1,3 h erreicht. In flüssigem Medium ist eine lag-Phase nur angedeutet. 1,5 Stunden nach Ansatz der Kultur beträgt hier die Verdoppelungszeit nur ca. 2 h; sie erreicht ca. 4,5 Stunden nach Ansatz der Kultur ein Minimum von ca. 1 h.

Die berechneten Verdoppelungszeiten von C. albicans liegen demnach unter den gegebenen Voraussetzungen niedriger als jene von BURNS (1956) sowie von MITCHISON und WALKER (1959) bei Cryptococcus diffluens bzw. Sch. pombe.

Bei Verwendung beider Nährmedien nimmt die Verdoppelungszeit etwa acht Stunden nach Ansatz der Kultur wieder zu, was auf eine Vergrösserung der Zelldichte zurückzuführen sein dürfte. Für Einbauversuche mit radioaktiv-markierten Nucleinsäure-Vorläufern eignet sich nach den vorliegenden Ergebnissen flüssiges Medium besonders deshalb, weil die Verdoppelungszeit nach einer nur kurzen lag-Phase über einen Versuchszeitraum von 6 Stunden hinweg nur 1 bis 2 h beträgt.

II. Zum DNS-Gehalt von Candida albicans

Bei einem Angebot fertiger Nucleinsäure-Vorläufer ersetzen diese nur einen Bruchteil der physiologischen DNS- bzw. RNS-Synthese. Um Aussagen über die prozentuale Beteiligung des verabreichten Vorläufers an dieser Synthese machen zu können, ist neben der Bestimmung der inkorporierten Vorläufermenge die Kenntnis des Nucleinsäuregehaltes bzw. der in einer Zeiteinheit neu synthetisierten Nucleinsäuremengen erforderlich. Da die DNS nur eine Neusynthese

erfährt, deren Ausmass bestimmbar ist, sie also keinem Umsatz unterworfen ist, kann eine Berechnung des prozentualen Anteiles exogener Vorläufer an der DNS-Synthese erfolgen. Anders hingegen liegen die Verhältnisse bei der RNS; da sie einem Umsatz unterliegt, können hier nur Schätzungen des prozentualen Anteiles verabreichter Vorläufer an der Synthese vorgenommen werden.

DASTIDAR (1966) untersuchte den DNS-Gehalt von C. albicans sowohl in der Hefe- wie auch in der Pseudomycel-Phase nach Perchlorsäureextraktion mit Hilfe der Diphenylaminreaktion. Bei der Hefe-Form ergab sich für den DNS-Gehalt ein Mittelwert von 11,63 µg/mg Trockengewicht (Minimalwert 11,3, Maximalwert 11,9 µg/mg); der DNS-Gehalt der Pseudomycel-Form lag indessen mit 10,86 µg/mg Trockengewicht (Minimalwert 10,50, Maximalwert 11,32 µg/mg) niedriger.

Ueber den DNS-Gehalt von Saccharomyces cerevisiae, einer C. albicans verwandten Art, liegen unterschiedliche Angaben vor: CHARGAFF und ZAMENHOF (1948) stellten nach der Diphenylamin- und Cysteinreaktion colorimetrisch einen DNS-Gehalt von $3{,}3 \times 10^{-14}$ g/Zelle fest. Spätere Untersuchungen von WILLIAMSON und SCOPES (1960) erbrachten an synchronisierten Kulturen von S. cerevisiae nach Extraktion mit Perchlorsäure (modifizierte Methode nach OGUR und ROSEN) Werte zwischen $0{,}86 \times 10^{-13}$ und $1{,}84 \times 10^{-13}$ g/Zelle. Der Unterschied zwischen den Ergebnissen von CHARGAFF und ZAMENHOF (1948) einerseits und WILLIAMSON und SCOPES (1960) andererseits mag durch die Verschiedenartigkeit der angewandten Methoden bedingt sein. Die Untersuchungen von WILLIAMSON und SCOPES (1960) an synchronisierten Kulturen zeigen, dass der DNS-Gehalt während der verschiedenen Abschnitte des Generationszyklus variieren kann. Vor der sog. 'bud'-Bildung bis zum Auftreten der ersten 'buds' bleibt der DNS-Gehalt nahezu konstant; erst später setzt offensichtlich eine Zunahme des DNS-Gehaltes/Zelle ein. Der Unterschied des DNS-Gehaltes zwischen 0,86 und $1{,}84 \times 10^{-13}$ g bei S. cerevisiae (WILLIAMSON und SCOPES, 1960) ist vermutlich damit zu erklären, dass im ersten Fall der DNS-Gehalt einer Kultur bestimmt wurde, deren Zellen ausschliesslich einen "einfachen DNS-Gehalt" aufwiesen, dagegen im zweiten Falle eine synchronisierte Kultur mit "doppeltem DNS-Gehalt" der Zellen untersucht wurde. Hieraus ergibt

sich, dass bei Untersuchungen des DNS-Gehaltes oder des Stoffwechsels der Nucleinsäuren dem Generationszyklus der Zellen besondere Beachtung zu schenken ist. Das führt zugleich zu der Auffassung, dass für entsprechende Untersuchungen nicht-synchronisierte Kulturen im exponentiellen Wachstum ein geeignetes System darstellen.

Die dargelegten Untersuchungen wurden mit nicht-synchronisierten Kulturen der Hefe-Form von C. albicans in flüssigem Nährmedium durchgeführt. Wie oben dargelegt, sind die Verdoppelungszeiten deutlichen Schwankungen unterworfen; sie nehmen in Systemen mit hoher Zelldichte zu. Dabei müsste zugleich mit einer Teilsynchronisation gerechnet werden. Das würde bedeuten, dass ein grösserer Prozentsatz der Zellen bereits die DNS-Verdoppelungsphase durchschritten hat und einen doppelten DNS-Gehalt aufweist. Der mittlere DNS-Gehalt der Gesamtpopulation müsste somit erhöht sein. Diese Ueberlegungen führten dazu, auch die Untersuchungen über den Einbau der markierten Vorläufer in Systemen mit geringerer Zelldichte durchzuführen, wobei zu Versuchsbeginn die maximale Konzentration $6{,}6 \times 10^{7}$ Zellen/ml betrug, wobei T im allgemeinen nicht über 6,8 lag.

Die Bestimmung des DNS-Gehaltes des vorliegenden Stammes von C. albicans erfolgte gleichfalls im Stadium des exponentiellen Wachstums bei einem T von 3,8 h. Der DNS-Gehalt beträgt unter diesen Voraussetzungen $2{,}41 \times 10^{-13}$ g/Zelle.

Um die von DASTIDAR (1966) gemachten Angaben DNS-Gehalt/Trockengewicht mit den eigenen Ergebnissen vergleichen zu können, wurde das Trockengewicht der Zellen vom vorliegenden Zellstamm untersucht. Das Trockengewicht der Einzelzelle beträgt $1{,}96 \times 10^{-11}$ g. Nach Umrechnung der von DASTIDAR (1966) angegebenen Werte (DNS/Trockengewicht) ergibt sich danach für die Hefe-Form von C. albicans ein mittlerer DNS-Gehalt von $2{,}28 \times 10^{-13}$ g/Zelle (Minimalwert: $2{,}22 \times 10^{-13}$, Maximalwert: $2{,}33 \times 10^{-13}$ g/Zelle). Dieser Wert liegt nur etwa 5 % unter dem hier ermittelten Wert von $2{,}41 \times 10^{-13}$ g/Zelle der Hefe-Form, womit eine gute Uebereinstimmung mit den von DASTIDAR (1966) erhobenen Befunden besteht. Der DNS-Gehalt von C. albicans ist

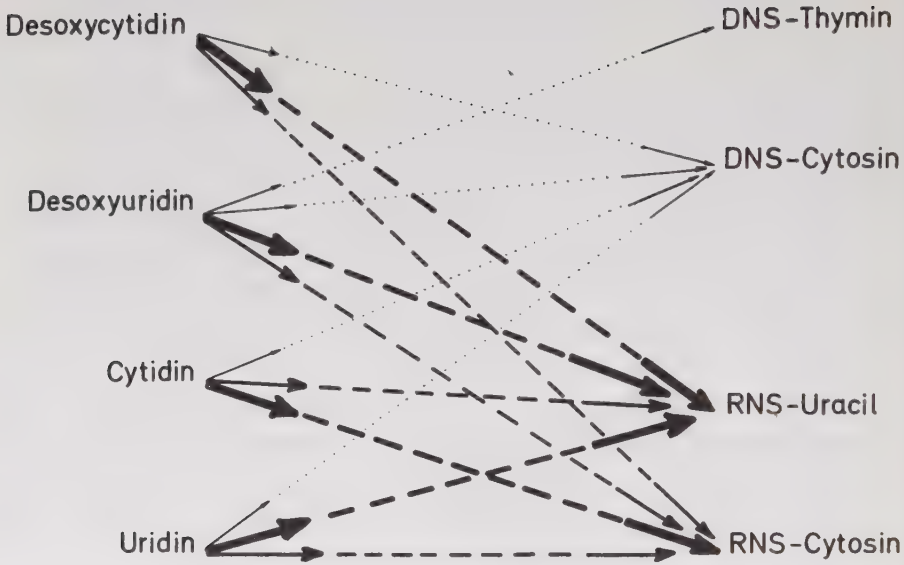

Abb. 8: Erklärung siehe im Text

jedoch offenbar wesentlich höher als jener von S. cerevisiae, wenn man die Befunde von WILLIAMSON und SCOPES (1959) zugrunde legt.

III. Ueber die Verwertung verschiedener Pyrimidinnucleoside und -desoxynucleoside für die Nucleinsäuresynthese von Candida albicans

Die mit verschiedenen Pyrimidinnucleosiden durchgeführten Inkorporationsversuche erfolgten sämtlich unter weitgehender Einhaltung gleicher Versuchsbedingungen. Inkubationszeit, Temperatur und Zellkonzentration zu Versuchsbeginn waren in allen Versuchen gleich. Keine Uebereinstimmung bestand bei der spezifischen Aktivität der verschiedenen Vorläufer. Hier wurde es vorgezogen, die höchstmögliche spezifische Aktivität anzuwenden. Dementsprechend waren die angebotenen Vorläuferkonzentrationen unterschiedlich. Diese bewegten sich - das ^{3}H-Thymidin ausgenommen - zwischen 0,44 und 7,01 x 10^{-3} mMol bzw. 0,10 und 1,6 µg/ml.

Die Abb. 8 soll einen schematischen Ueberblick über die Utilisation der verschiedenen Vorläufer für die neugebildeten Pyrimidinnucleoside geben. In der Tabelle 7 ist die prozentuale Verteilung der ^{3}H-Aktivität in den Pyrimidinnucleotiden für alle untersuchten Vorläufer zusammengefasst. Eine entsprechende Uebersicht über die prozentuale Beteiligung der verabreichten Vorläufer an neugebildeten Pyrimidinnucleotiden gibt die Tabelle 8. Es soll nochmals hervorgehoben werden, dass bei einer vergleichenden Betrachtung der Werte zwei Gesichtspunkte zu berücksichtigen sind: 1. Es wurde von einem RNS-Gehalt der Zellen von 5,0 x 10^{-13} g/Zelle (DASTIDAR, 1966) ausgegangen. Dieser Wert wurde auch der Berechnung der prozentualen Beteiligung der Vorläufer an den neugebildeten Pyrimidinnucleotiden der RNS zugrundegelegt. Unberücksichtigt blieb dabei, dass die RNS einem Umsatz unterworfen ist, dessen Grösse nicht bekannt ist. Es kann daher angenommen werden, dass verabreichte Vorläufer in diesen Umsatz einbezogen werden. 2. Die Anwendung unterschiedlicher Vorläuferkonzentrationen gestattet nur einen annähernden Vergleich der mit den verschiedenen Vorläufern gewonnenen Ergebnisse.

Tabelle 7

Vorläufer:	Prozentuale Verteilung der ^3H-Aktivität						
	in den Pyrimidinnucleotiden				in den Pyrimidinnucleotiden der		
	TMP	dCMP	UMP	CMP	DNS	RNS	$\frac{DNS}{RNS}$
^3H-CdR-(5-T)	—	1,53	74,0	24,5	1,5	98,5	$\frac{1}{65,7}$
^3H-CdR (G)	0,548	1,18	77,6	20,7	1,7	98,3	$\frac{1}{57,8}$
^3H-UdR (G)	5,12	4,75	76,3	13,8	9,9	90,1	$\frac{1}{9,1}$
^3H-Cytidin (G)	0,137	5,11	15,1	79,6	5,3	94,7	$\frac{1}{17,9}$
^3H-Uridin (G)	0,32	1,28	76,2	22,2	1,6	98,4	$\frac{1}{61,5}$

Tabelle 8

Vorläufer:	Prozentuale Beteiligung der verabreichten Vorläufer						
	an neugebildeten Pyrimidinnucleotiden				a.d. neugeb. Pyrimidinnucleotiden der		
	TMP	dCMP	UMP	CMP	DNS	RNS	$\frac{DNS}{RNS}$
^3H-CdR-(5-T)	—	0,002'0	0,035	0,011	0,002'0	0,046	$\frac{1}{23,0}$
^3H-CdR-(G)	0,001'1	0,004'5	0,11	0,028	0,005'6	0,138	$\frac{1}{24,6}$
^3H-UdR-(G)	0,002'1	0,003'7	0,021	0,003'8	0,005'8	0,024'8	$\frac{1}{4,3}$
^3H-Cytidin-(G)	0,005'4	0,37	0,39	2,0	0,375'4	2,39	$\frac{1}{6,4}$
^3H-Uridin-(G)	0,020	0,15	3,3	0,93	0,17	4,23	$\frac{1}{24,9}$

Das mit zwei verschiedenen Markierungsformen angewandte ^{3}H-CdR führte zu einer ähnlichen prozentualen Verteilung der ^{3}H-Aktivität in den Pyrimidinnucleotiden der DNS und der RNS. Die höhere prozentuale Beteiligung des ^{3}H-CdR (G) an neugebildeten Nucleotiden mag darauf zurückzuführen sein, dass dieses im Gegensatz zum ^{3}H-CdR (5-T), welches in einer Konzentration von 0,10 µg/ml vorlag, in einer Konzentration von 0,475 µg/ml angeboten wurde. Das Verhältnis der Utilisation für DNS und RNS beträgt ca. 1 : 62, wobei etwa 76 % für das Uridinmonophosphat verwertet wurden und ein geringerer Teil für das Cytidinmonophosphat. Im Hinblick auf die Utilisation des CdR für RNS-Cytosin und insbesondere RNS-Uracil ist festzustellen: Nach Untersuchungen von REICHARD und ESTBORN (1951) an tierischen Zellen gilt die Annahme der Irreversibilität der Ribosereduktion; das bedeutet, dass ein verabreichtes Desoxynucleosid nicht für die RNS verwertet werden kann. Vorstellbar allerdings wäre, dass lediglich der Basenanteil des Vorläufers für die Nucleoside verwendet wird. Bei Verwendung der "generally-labeled-Form" hätte sich sodann infolge des Verlustes der Desoxyribose ein wesentlich geringerer prozentualer Anteil der ^{3}H-Aktivität in den Nucleosiden der DNS finden müssen als bei Verwendung von ^{3}H-CdR (5-T). Hieraus ergibt sich, dass bei Hefe-Zellen im Gegensatz zu den Feststellungen von REICHARD und ESTBORN (1951) eine Oxydation des Zuckers möglich ist.

Auch das Desoxyuridin wird ebenso wie das Uridin für RNS-Uracil verwertet. Beide, insbesondere das Uridin, werden jedoch auch für die Pyrimidinnucleotide der DNS utilisiert. Das Cytidin stellt in erster Linie einen Vorläufer des RNS-Cytosin, in geringerem Masse für RNS-Uracil dar.

Betrachtet man die prozentuale Beteiligung aller Vorläufer an neugebildeten Pyrimidinnucleotiden, so wird ersichtlich, dass diese nur zu einem sehr geringen Prozentsatz an den neugebildeten Nucleotiden beteiligt sind. Am günstigsten liegen die Verhältnisse bei ^{3}H-Uridin, das mit 4,4 % beteiligt ist; das Cytidin steht mit ca. 3.0 % an zweiter Stelle; danach folgen das ^{3}H-CdR mit etwa 0,14 %

und schliesslich das ^{3}H-UdR mit ca. 0,031 %, obgleich dieses unter allen verwendeten Vorläufern in der höchsten Konzentration, nämlich von 1,6 µg/ml, vorlag.

Bei der Suche nach einem Vorläufer der DNS ergibt sich, dass hier am ehesten UdR und ferner das Cytidin in Betracht kommen. Das CdR und das Uridin werden in besonders hohem Masse für die RNS utilisiert. Keines der untersuchten Nucleoside kann als spezifischer Vorläufer der DNS gelten. Bei Ausschau nach einem RNS-Vorläufer fällt das Augenmerk auf CdR und Uridin, da beide in besonders hohem Masse für die RNS utilisiert werden. Hier ist dem Uridin jedoch der Vorzug zu geben, da es von allen untersuchten Vorläufern die höchste prozentuale Beteiligung an neugebildeten Pyrimidinnucleotiden zeigte.

IV. Ueber die Verwertung des ^{3}H-Thymidin für die DNS-Synthese von C. albicans

Ueber die Inkorporation von radioaktiv-markiertem Thymidin in Hefezellen berichtete LOCHMANN (1965); bei Versuchen mit S. cerevisiae führte selbst das Angebot grosser Mengen des markierten Vorläufers im Kulturmedium nur zu einer geringfügigen Aufnahme in die Zellen.

Die hier dargelegten biochemischen Untersuchungen über einen Einbau von ^{3}H-TdR in die DNS von C. albicans erbrachten keine eindeutigen Ergebnisse. Selbst das Angebot von ^{3}H-Thymidin in der Konzentration von 0,19 µg bzw. 0,78 x 10^{-3} mMol TdR/ml (spez. Aktivität 10 C/mMol) über eine Inkubationszeit von 4 Stunden bei einer Verdoppelungszeit von 3,75 Stunden hatte nur eine minimale Beteiligung des angebotenen Vorläufers an der DNS-Synthese zur Folge. Nach der ^{3}H-Aktivitätsbestimmung der extrahierten Nucleinsäuren betrug der prozentuale Anteil des angebotenen ^{3}H-TdR an dem während des Versuches neugebildeten DNS-Thymin lediglich 0,00012. Es wurde daher versucht, bei Anwendung noch höherer Konzentrationen ^{3}H-markierten Thymidins mit Hilfe der autoradiographischen Technik einen Einbau in die DNS nachzuweisen. Durch die gewählte Versuchsanordnung sollte zugleich festgestellt werden, ob eine in den Zellen nachweisbare ^{3}H-Aktivität

in Form säurelöslicher Bestandteile vorliegt oder fest in die DNS eingebaut ist. Hierzu wurde ^{3}H-Thymidin mit einer Aktivität von 50 µC/ml bei einer spez. Aktivität von 16,4 C/mMol verwendet, was einer Thymdidinkonzentration von 0,74 µg/ml bzw. 3,03 x 10^{-3} mMol gleichkommt, und eine Inkubationszeit von 8 Stunden gewählt.

Danach konnten bei einer Expositionszeit von 5 Tagen in den Autoradiogrammen Silberkörner über den Zellen gefunden und eine quantitative Auswertung vorgenommen werden. Diese Silberkörner wurden nach einstündiger Waschung in 5 %-iger Trichloressigsäure und dreistündiger Waschung in 0,05 %-iger Lösung nicht-radioaktiv-markierten Thymidins beobachtet. Eine derartige, in der autoradiographischen Technik allgemein angewandte Waschung ist erforderlich, um nicht in die DNS eingebaute ^{3}H-Aktivität zu entfernen.

Die ermittelte Silberkornzahl pro Zelle kann zu einer annähernden Berechnung der Menge des von den Zellen inkorporierten Vorläufers herangezogen werden. Voraussetzung hierfür ist die Kenntnis der spezifischen Aktivität des verwendeten Vorläufers sowie der Zahl der radioaktiven Zerfälle, die zur Erzeugung eines Silberkorns erforderlich sind. Die spezifische Aktivität des verwendeten ^{3}H-TdR ist bekannt. Ueber das Verhältnis der radioaktiven Zerfälle/Silberkorn wurden von HUGHES et al. (1958) Untersuchungen an Bakterien durchgeführt; danach sind 5 Zerfälle zur Erzeugung eines Silberkorns erforderlich. Weitgehend entsprechende Verhältnisse dürften auch für C. albicans gelten, weshalb hier von einem Absorptionskoeffizienten = 0,2 ausgegangen werden soll. - Die hier zugrundegelegte "Silberkornzahl pro Zelle" ist das Produkt aus der ermittelten "Silberkornzahl pro markierte Zelle" und dem "^{3}H-Index", d.h. des Anteiles markierter Zellen, bezogen auf alle untersuchten Zellen. Diese "Silberkornzahl pro Zelle" betrug, bezogen auf eine Expositionszeit von 1 Tag, ca. 0,64.

Die den Berechnungen zugrundeliegenden Daten und Zwischenergebnisse sollen hier nur kurz mitgeteilt werden: Eine Silberkornzahl/Zelle von 0,64 bei einer Expositionszeit von 1 Tag entspricht bei einem Absorptionskoeffizienten von 0,2 einer Anzahl von 0,00223 Zerfällen/

Minute (=dpm). Bei der verwendeten spezifischen Aktivität von 16,4 C/mMol sind 3,65 x 10^{13} dpm/0,242 g TdR gegeben. Demnach entsprechen 0,00223 dpm einer Thymidinmenge von 1,37 x 10^{-17} g. - Während der achtstündigen Inkubationszeit wurde ein Zellzuwachs von 38.86 x 10^{6} Zellen/ml bestimmt. Legt man einen mittleren DNS-Gehalt von 2,416 x 10^{-13} g/Zelle zugrunde, so ergibt sich hieraus eine Menge neugebildeter DNS von 9,4 x 10^{-6} g/ml. - Ebenso lässt sich die ^{3}H-TdR-Menge berechnen, die von den in 1 ml enthaltenen Zellen aufgenommen wurde; sie beträgt 4,03 x 10^{-12} g. Aufgrund des Basenverhältnisses 35,1/64,9, Cytosin/Thymin (STENDERUP und BAK, 1968) kann der Anteil neugebildeten DNS-Thymins aus der Menge neugebildeter DNS (9,4 x 10^{-6} g/ml) berechnet werden; er beträgt 1,86 x 10^{-6} g. Setzt man die während der Inkubationszeit aufgenommene ^{3}H-TdR-Menge von 4,03 x 10^{-12} g/ml Zellsuspension in das Verhältnis zu dem im gleichen Zeitraum und in der gleichen Zellmenge neusynthetisierten DNS-Thymin, so ergibt sich ein prozentualer Anteil des exogenen ^{3}H-Thymidins am neusynthetisierten DNS-Thymin von 0,00023 %.

Da bei dem angewandten ^{3}H-TdR-(methyl-T) das markierende Isotop an Stelle eines Wasserstoffatomes der Methylgruppe der Base Thymin steht, kann eine radioaktive Markierung der Nucleinsäuren nur von einem Einbau des ^{3}H-TdR als DNS-Thymin herrühren. Bei einer Verwertung für die Nucleinsäuren in anderer Form dürfte keine radioaktive Markierung mehr gegeben sein, da dieser eine Demethylierung des Thymidins und somit der Verlust des markierenden Isotopes vorausgehen müsste.

Um festzustellen, ob die ausserordentlich geringen Mengen von ^{3}H-TdR, die von den Zellen aufgenommen wurden, tatsächlich Bestandteil der DNS darstellen, erfolgten weitere Untersuchungen. Tropfpräparate wurden einerseits einer 1-, 2-, 4- und 8-stündigen Waschung in 5 %-iger TCE-Lösung, andererseits nach dem gleichen Verfahren einer zusätzlichen Waschung mit 0,05 %-iger inaktiver TdR-Lösung unterworfen. Dieses Verfahren sollte dazu dienen, nicht in die DNS eingebautes ^{3}H-TdR oder dessen Abbauprodukte aus den Zellen herauszulösen. Beide Verfahren führten zu einer geringen, jedoch nicht sig-

nifikanten Verminderung der Silberkornzahl in den nach dieser Waschprozedur angefertigten Autoradiogrammen. Das kann als Hinweis darauf aufgefasst werden, dass die inkorporierte ^{3}H-Aktivität in nicht-säurelöslicher Form vorliegt, und ein Einbau in die DNS kann angenommen werden.

In einem weiteren Versuch wurde Zellmaterial aus dem o.g. Experiment verwendet. Es wurde 4 Tage bei 20°C in physiologischer Kochsalzlösung mit bzw. ohne Thymidinzusatz gehalten. Zellzählungen nach dem 1., 2. und 4. Tage liessen in Thymidin-freier NaCl-Lösung keinerlei Zellvermehrung nach dem Ansatz erkennen; in Thymidin-haltigem Medium hingegen fand eine geringe, jedoch signifikante Zellvermehrung statt. In physiologischer Kochsalzlösung sistiert demnach das Wachstum völlig; ein Ansatz von 5 µg TdR/ml bietet den Zellen die Möglichkeit zum Wachstum.

Silberkornzählungen ergaben nach eintägigem Aufenthalt der Zellen in den genannten Lösungen eine signifikante Abnahme der Silberkornzahl/Zelle gegenüber dem Tag 0. Zwischen dem 1. und 4. Tage erfolgte eine weitere, allerdings geringere Verminderung der SkZ/Zelle. Eine viertägige Aufbewahrung der Zellen in beiden Medien führte zu einer Verringerung der SkZ/Zelle um ca. 32 %. Aus diesen Ergebnissen muss der Schluss gezogen werden, dass die in den Zellen nachgewiesene ^{3}H-Aktivität nicht, zumindest nicht ausschliesslich,Bestandteil der DNS darstellt.

Aus allen Ergebnissen der Untersuchungen mit ^{3}H-TdR ergeben sich zusammenfassend folgende Schlussfolgerungen: Angebotenes ^{3}H-TdR kann nur in einem äusserst geringen Bruchteil in den Zellen von C. albicans nachgewiesen werden. Setzt man voraus, dass dieses ^{3}H-TdR in die DNS eingebaut wird, so beträgt sein Anteil an neusynthetisiertem DNS-Thymin etwa 0,0001 - 0,00025 %. Es ist jedoch unsicher, ob die nachgewiesene ^{3}H-Aktivität ausschliesslich oder zum Teil von ^{3}H-Thymidin herrührt, das als DNS Thymidin utilisiert wurde. Vielmehr kann angenommen werden, dass die ^{3}H-Aktivität, die in säureunlöslicher Form vorliegt, in anderer Form gebunden ist. Hier-

für spricht die Tatsache, dass bei einem Sistieren des Wachstums die autoradiographisch nachweisbare ^{3}H-Aktivität abnimmt. Eine derartige Abnahme wäre unwahrscheinlich, wenn das angebotene ^{3}H-TdR Bestandteil neusynthetisierter DNS geworden wäre.

Von tierischen Geweben und Zellkulturen ist bekannt, dass sie angebotenes ^{3}H-TdR zu einem messbaren Bruchteil für die DNS- bzw. Thymidylsäure-Synthese verwenden. Dieser Bruchteil ist abhängig von der Menge des angebotenen Thymidins; er liegt bei der Maus zwischen 0,1 und 60 %, bei HeLa-Zellen zwischen ca. 0,3 und 25 % (LANG, MÜLLER, MAURER, 1968). Die in den autoradiographischen Untersuchungen mit C. albicans angewandte Thymidin-Konzentration von 0,74 µg/ml hätte danach bei HeLa-Zellen zu einer annähernd 20 %-igen Beteiligung des exogenen ^{3}H-TdR an neugebildetem DNS-Thymin geführt. Nicht in die DNS eingebautes ^{3}H-TdR wird von Warmblüterorganismen und Zellkulturen rasch abgebaut, wobei z.B. bei HeLa-Zellen die Abbauprodukte β-Ureidoiso-buttersäure, Thymin und Dihydrothymin sind (LANG, MÜLLER und MAURER, 1966). Es darf daher angenommen werden, dass C. albicans gleichfalls angebotenes ^{3}H-Thymidin metabolisiert. Grundsätzlich ist jedoch festzustellen, dass radioaktiv-markiertes Thymidin nicht als spezifischer Vorläufer der DNS bei Candida albicans anwendbar ist.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der Untersuchung war, die Eignung der Pyrimidinnucleoside Thymidin (TdR), Desoxycytidin (CdR), Desoxyuridin (UdR), Cytidin (CR) und Uridin (UR) als Vorläufer der Nucleinsäuren von Candida albicans zu prüfen. Hierfür wurden Tritium-markierte Nucleoside verwendet, die C. albicans in flüssigem Nährmedium bei 30°C angeboten wurden.

Zur Berechnung des prozentualen Anteils der angebotenen Nucleoside an neusynthetisierten Nucleosiden war die Kenntnis des Trockengewichtes der Zellen und ihres DNS-Gehaltes erforderlich. Das Trokkengewicht der Einzelzelle von C. albicans beträgt $1{,}96 \times 10^{-11}$ g; sie hat in der Hefeform bei einer Verdoppelungszeit von ca. 3,8 h in nicht-synchronisierten Kulturen einen mittleren DNS-Gehalt von $2{,}41 \times 10^{-13}$ g. Eine weitere Voraussetzung war die Kenntnis der Verdoppelungszeiten in flüssigem Medium und auf festem Nährboden. Es wurde flüssiges Nährmedium bevorzugt, da hierin die "lag-Phase" nach der Zellaussaat von kürzerer Dauer ist und da hierin über längere Zeit hinweg kurze Verdoppelungszeiten von minimal 1 h bestehen.

Die Extraktion der Nucleinsäuren geschah mit Trichloressigsäure bei 90°C. Die Nucleinsäuren wurden enzymatisch abgebaut und nachfolgend die Pyrimidinnucleotide voneinander hochspannungselektrophoretisch und papierchromatographisch getrennt. Es wurde sowohl die ^{3}H-Aktivität der extrahierten Nucleinsäuren wie auch der aufgetrennten Pyrimidinnucleotide bestimmt.

Die Nucleoside CdR, UdR, CR und UR sind nur in einem sehr geringen Prozentsatz an den neugebildeten Nucleotiden beteiligt (UR ca. 4,4 %, CR ca. 3,0 %, CdR ca. 0,14 %, UdR ca. 0,031 %). Als Vorläufer für die DNS sind CR und UdR geeignet; sie werden für die DNS und RNS in einem Verhältnis von 1 : 6,4 bzw. 1 : 4,3 utilisiert. Dem Cytidin ist dabei der Vorzug zu geben, da seine Beteiligung an neugebildeten Nucleotiden wesentlich höher ist als das von UdR. Für die RNS werden in besonders hohem Masse CdR und UR utilisiert; hier ist wegen der stärkeren Beteiligung an der Neusynthese dem Uridin der Vorzug zu

geben. Keiner der genannten Vorläufer wird ausschliesslich entweder in die DNS oder RNS eingebaut und wäre demnach als "spezifischer" Vorläufer zu bezeichnen.

Nach Thymidingabe sind nach den Ergebnissen biochemischer und autoradiographischer Untersuchungen auch bei hohen Vorläuferkonzentrationen (0,74 µg/ml) nur ^{3}H-Aktivitäten in äusserst geringen Mengen in den Zellen nachweisbar, die einer Beteiligung an der Neusynthese von DNS-Thymin von ca. 0,0001-0,00025 % entsprechen würden. Es ist zweifelhaft, ob es sich bei der hier nachgewiesenen ^{3}H-Aktivität um ^{3}H-DNS-Thymin handelt. ^{3}H-Thymidin kann demnach nicht als DNS-Vorläufer von C. albicans bezeichnet werden.

F. LITERATURVERZEICHNIS

AMANO, M., MESSIER, B. and LEBLOND, C.P.: Specifity of labeled Thymidine as a Deoxyribonucleic Acid Precursor in Radioautography.
J. Histochem. Cytochem. 7, 153-155 (1959)

BENDICH, A., GETLER, H. and BROWN, G.B.: A Synthesis of Isotopic Cytosine and a Study of its Metabolism in the Rat.
J. biol. Chem. 177, 565-570 (1949)

BURNS, V.W.: Temporal Studies of Cell Division. I. The Influence of Ploidy and Temperature on Cell Division in Sacch. Cerevisiae.
J. Cell. Comp. Phys. 47, 357-375 (1956)

CANNELAKIS, E.S.: Some aspects of the Metabolism in Vitro of 2-C^{14} Labeled Orotic Acid, Uracil, Uridine, and Uridylic Acid.
Fed. Proc. 14, 324 (1955)

CHARGAFF, E. and ZAMENHOF, S.: The Isolation of Highly Polimerized Deoxypentosenucleic Acid from Yeast Cells.
J. biol. Chem. 173, 327-335 (1948)

COOPER, E.H. and MILTON, J.D.: The Incorporation and Degradation of Pyrimidine DNA Procursors by Human Leucocytes.
Brit. J. Cancer. 18, 701-713 (1964)

DASTIDAR, S.G.: Studies on Nucleic Acids and Protein Content of Candida Albicans and their Relationship to Diphorism.
Indian J. Exp. Biol. 4, 51-52 (1966)

DISCHE, Z.: Ueber einige neue charakteristische Farbreaktionen der Thymonukleinsäure und eine Mikromethode zur Bestimmung derselben in tierischen Organen mit Hilfe dieser Reaktionen.
Mikrochemie 8, 4-32 (1930)

DOMAGK, G.F: Nucleotidstoffwechsel
Aus: HARBERS, E., G.F. DOMAGK und W. MÜLLER: Die Nukleinsäuren.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1964

HAMMARSTEN, E., REICHARD, P. and SALUSTE, E.: Pyrimidine Nucleosides as Precursors of Ribonucleic Acid Pyrimidines.
Acta chem. scand. 3, 432 (1949)

HAMMARSTEN, E., REICHARD, P. and SALUSTE, E.: Pyrimidine Nucleosides as Precursors of Pyrimidines in Polynucleotides.
J. Biol. Chem. 183, 105 (1950)

HAUG, H.: Die Treffermethode, ein Verfahren zur quantitativen Analyse im histologischen Schnitt.
Zeitschr. für Anatomie und Entwicklungsgeschichte 118, 302-312 (1955)

HUGHES, W.L., BOND, V.P., BRECHER, G., CRONKITE, E.P., PAINTER R.B., QUASTLER, H. and SHERMAN, F.G.: Cellular Proliferation in the Mouse as Revealed by Autoradiography with Tritiated Thymidine. Proc. nat. Acad. Sci. 44, 476 (1958)

JAQUEZ, J.A.: Transport and Encymatic Splitting of Pyrimidine Nucleosides in Ehrlich Cells. Biochim. Biophys. Acta 61, 265-277 (1962)

LANG, W., MÜLLER, D. and MAURER, W.: Determination of Thymidine Metabolism in HeLa Cell Cultures by a combined Electrophoretic and Paper Chromatographic Method. Exptl Cell Res. 44, 645-648 (1966)

LANG, W., MÜLLER, D. und MAURER, W.: Prozentuale Beteiligung von exogenem Thymidin an der Synthese von DNS-Thymin in Geweben der Maus und in HeLa-Zellen. Exptl Cell Res. 49, 558-571 (1968)

LANG, W., PILGRIM, C. und MAURER, W.: Prozentualer Anteil von ^{3}H- oder ^{14}C-Thymidin an der DNS-Synthese von Zellarten der Maus. Naturwissenschaften 53, 210 (1966)

LENNARTZ, K.J. und MAURER, W.: Autoradiographische Bestimmung der Dauer der DNS-Verdopplung und der Generationszeit beim Ehrlich-Ascitestumor der Maus durch Doppelmarkierung mit ^{14}C- und ^{3}H-Thymidin. Z. Zellforsch. 63, 478-495 (1964)

LOCHMANN, E.R.: Markierung von Saccharomyces-DNS mit radioaktivem Thymin. Naturwissenschaften 52, 498 (1965)

MARKHAM, R. and Smith J.D.: Chromatographic Studies on Nucleic Acids. 3. The Nucleic Acids of five Strains of Tobacco Mosaic Virus. Biochem. J. 46, 513-517 (1950)

MARSH, J.C. and PERRY, S.: Thymidine Catabolism by Normal and Leucemic Human Leucocytes. J. clin. Invest. 43, 267-278 (1964)

MEJBAUM, W.: Ueber die Bestimmung kleiner Pentosemengen insbesondere in Derivaten der Adenylsäure. Z. phys. Chem. 258, 117-120 (1939)

MITCHISON, J.M. and WALKER, P.M.B.: RNA-Synthesis During the Cell Life Cycle of a Fission Yeast Schizosaccharomyces pombe. Exptl Cell Res. 16, 49-58 (1959)

MÜLLER, D.: Autoradiographische Untersuchungen an HeLa-Zellen über die Brauchbarkeit des ^{3}H-Desoxycytidins als spezifischer Vorläufer der Desoxyribonukleinsäure. Exptl Cell Res. 44, 627-631 (1966)

MÜLLER, H.-L., KOEPPE, K. und SCHIFF, W.: Die Chlamydosporenbildung und ihre Verwendung zur Schnelldiagnostik der Sprosspilze.
Zbl. Bakt. I Orig. 203, 403-415 (1967)

PLENTL, A.A. and SCHOENHEIMER, R.: Studies of the metabolism of Purines and Pyrimidines by Means of Isotopic Nitrogen.
J. biol. Chem. 153, 203-217 (1944)

RACHMELER, M., GERHART, J. and ROSNER, J.: Limited Thymidine uptake in Escherichia coli due to an Inducible Thymidine Phosphorylase.
Biochim. biophys. Acta. 49, 222-225 (1961)

REICHARD, P. and ESTBORN, B.: Utilization of Deoxyribosides in the Synthesis of Polynucleotides.
J. biol. Chem. 188, 839-846 (1951)

SARKAR, S.K. and PODDAR, R.K.: Non-Conservation of ^{3}H-Thymidine Label in the DNA of Growing Yeast Cells.
Nature 207, 550-551 (1965)

SCHNEIDER, W.C.: Phosphorus Compounds in Animal Tissues. I. Extraction and Estimation of Deoxypentose Nucleic Acid and of Pentose Nucleic Acid.
J. biol. Chem. 161, 293-303 (1945)

STENDERUP, A. and BAK, A.L.: Deoxyribonucleic Acid Base Composition of Some Species within the Genus Candida.
J. gen. Microbiol. 52, 231-236 (1968)

STEWART, P.A., QUASTLER, H. and SKOUGAARD, M.R.: Four-Faktor Model Analysis of Thymidine Inkorporation into Mouse DNA and the Mechanism of Radiation Effects.
Radiation Res. (N.Y.) 24, 521-537 (1965)

WILLIAMSON, D.H. and SCOPES, A.W.: The Behaviour of Nucleic Acids in Synchronously Dividing Cultures of Saccharomyces cerevisiae.
Exptl Cell Res. 20, 338-349 (1960)

ZAJICEK, G., BERNSTEIN, N., ROSIN, A. and GROSS, J.: Studies on the In Vitro Incorporation of Tritiated Thymidine into Ascites Tumor Cells.
Exptl Cell Res. 31, 390-396 (1963)

Herrn Privatdozent Dr. med. D. Müller danke ich für die Ueberlassung des Themas sowie für die stets freundliche und grosszügige Unterstützung bei der Durchführung der Experimente und bei der Anfertigung der Arbeit.

Ebenso bin ich Frau Privatdozent Dr. med. H.-L. Müller zu grossem Dank verpflichtet für ihre vielen guten Ratschläge, besonders was den experimentellen Teil der Arbeit betrifft.

Herrn Professor Dr. med. R. Siegert danke ich für die Möglichkeit, in seinem Institut die experimentellen Arbeiten durchführen zu können.

Schliesslich gilt mein Dank auch allen Mitarbeitern von Herrn Dr. med. D. Müller für ihre Hilfe.

Lebenslauf

Am 24. November 1941 wurde ich, Karl-Ulrich Sander, als Sohn des Friseurs Karl Sander und seiner Ehefrau Karoline, geb. Volkmar, in Kassel geboren.

Von 1947 bis 1951 besuchte ich die Grundschule in Spangenberg, Kreis Melsungen, und anschliessend bis Ostern 1952 in Marburg. Nach Ablegung der Reifeprüfung an dem Realgymnasium für Jungen in Marburg im Jahre 1961 begann ich im Sommersemester des gleichen Jahres mit dem Studium der Zahnheilkunde an der Philipps-Universität in Marburg, wo ich 1963 das Physikum und im August 1966 das Staatsexamen bestand.

Von Oktober 1966 bis Juli 1967 beschäftigte ich mich mit dem experimentellen Teil der vorliegenden Arbeit und trat im September 1967 eine Assistentenstelle in Kassel an. Im Frühjahr 1970 habe ich mich dann als Zahnarzt in Bad Hersfeld niedergelassen.

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren folgende Professoren und Dozenten:

Amon, Bommer, Braun-Falco, Brück, Bücher, Cleve, Dimroth, Dölle, Gedigk, Hennis, Hensel, Hering, Heuser, Hohorst, Janke, Klingenberg, Korb, Kottmeyer, Lang, Mahr, Marx, Mattes, Maurath, Niessing, Pantke, Petry, Pfütz, Rodeck, Rosemann, Schiff, Schmid, Schmidt, Seidel, Siegert, Vogt, Walcher.